

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní obor: Biologie – Anatomie a fyziologie rostlin



Variabilita a mechanismy diferenciace exodermis v kořenech rostlin

Variability and mechanisms of exodermis differentiation in plant roots

Bc. Zuzana Blascheová

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Praha 2016

1. Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

2. Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě jakkoli podporovali a podporují během mého studia. Velmi děkuji mé školitelce, RNDr. Editě Tylové, Ph.D., za laskavý, téměř mateřský přístup, andělskou trpělivost a porozumění, schopnost nadchnout a motivovat, skvělý hudební vkus a lidskost. Děkuji RNDr. Aleši Soukupovi, Ph.D., za nápady a rady ohledně tématu výzkumu. Děkuji Ing. Yvettě Šefrnové za její přátelství, schopnost motivovat, pozitivní naladění a především za obrovské praktické zkušenosti, které nám všem ochotně předává. Je zářným příkladem toho, že bez praktického a zkušeného laboranta se žádná laboratoř neobejde. Děkuji Mgr. Šárce Benešové za přátelství a podporu v životě i ve škole. Děkuji Mgr. Tereze Šnajdrové za přátelství, podporu a neochvějnou pozitivní náladu. Děkuji RNDr. Anně Jánské, Ph.D., Mgr. Marku Širlovi, Mgr. Marku Šustrovi, Bc. Jiřímu Namyslovovi a všem ostatním členům anatomické laboratoře, že tvoříme tak úžasnou partu lidí, kde jeden druhému neváhá pomoci. Stejně tak děkuji naší katedře za to, že se skládá z tak skvělého a záviděníhodného kolektivu lidí. Neméně důležitý dík patří mé rodině a blízkým, kteří mě při mém studiu podporují. Vím, že to zdaleka není samozřejmost a velmi si toho vážím. Děkuji, že vydrželi období sepisování této práce. Člověk velmi ocení, když si během tohoto procesu může s někým promluvit. Ještě jednou děkuji všem výše zmíněným. Velmi si vážím podpory, kterou jste mi poskytli. Občas to se mnou není lehké. O to víc oceňuji, že i tak to se mnou vydržíte.

3. Obsah

1. Prohlášení	3
2. Poděkování	4
3. Obsah	4
4. Abstrakt	8
5. Abstract	9
6. Seznam zkratek	10
7. Úvod	12
7.1 Cíle práce	14
8. Přehled literatury	15
8.1 Apoplastické bariéry	15
8.2 Vývoj apoplastických bariér	16
8.2.1 Endodermis	16
8.2.2 Exodermis	18
8.3 Plasticita vývoje bariér v odpovědi na podmínky prostředí	19
8.3.1 Kadmium a další těžké kovy	20
8.3.2 Salinita a osmotický stres	24
8.3.3 Hypoxie a zaplavení	26
8.3.4 Nízký vodní potenciál a hospodaření s vodou	26
8.4 Molekulární mechanismy diferenciacce endodermis	27
8.4.1 SHORT-ROOT a SCARECROW	27
8.4.2 MYB DOMAIN PROTEIN 36	28
8.4.3 Vznik a umístění Casparyho proužku	30
8.4.4 CASP proteiny	30
8.4.5 Evoluce a zařazení CASP	32
8.4.6 Role NADPH oxidázy RBOHF a peroxidázy PER64	33
8.4.7 ESB1, protein s „řídící“ doménou	34

8.4.8 Polarita endodermis	34
8.4.9 Ortology CASP genů u kukuřice - ZmCASP1 a ZmCASP2	35
9. Metodika.....	38
9.1 Pěstování rostlin	38
9.1.1 Experiment 1 – Analýza vlivu kadmia na postup diferenciac apoplastických bariér v různých typech kořenů kukuřice	38
9.1.2 Experiment 2 – Analýza kombinovaného vlivu kadmia a hypoxie na postup diferenciac apoplastických bariér v kořenech cibule.....	39
9.1.3 Experiment 3 – Analýza exprese genů ZmCASP u kukuřice	39
9.2 Vyhodnocení vlivu kadmia na postup diferenciac apoplastických bariér u kukuřice (experiment 1)	40
9.2.1 Morfologická analýza kořenů.....	40
9.2.2 Anatomická analýza kořenů	40
9.2.3 Elektronová mikroskopie	42
9.2.4 Testy permeability	42
9.3 Vyhodnocení kombinovaného vlivu kadmia a hypoxie na postup diferenciac apoplastických bariér u cibule (Experiment 2).....	43
9.4 Analýza exprese genů <i>ZmCASP</i> v kořenech kukuřice (Experiment 3).....	43
9.4.1 Odběr materiálu.....	43
9.4.2 Anatomická analýza nodálních kořenů	44
9.4.3 Navržení primerů pro <i>CASP</i> geny	44
9.4.4 Izolace genomové DNA z kořenů kukuřice	45
9.4.5 Izolace mRNA.....	45
9.4.6 RT-PCR.....	46
9.4.7 Polymerázová řetězová reakce	47
9.4.8 Agarózová gelová elektroforéza.....	49
9.4.9 Izolace DNA fragmentů z gelu.....	50
9.4.10 Sekvenace.....	50

9.4.11 Statistické zpracování dat.....	51
10. Výsledky.....	52
10.1 Vliv kadmia na diferenciaci bariér v kořeni kukuřice (Experiment 1).....	52
10.1.1 Morfologie primárního kořene	52
10.1.2 Vývoj endodermis pod vlivem Cd	56
10.1.3 Vývoj exodermis pod vlivem Cd	60
10.1.4 Propustnost apoplastu povrchových vrstev kořenů	65
10.2 Vliv kadmia a hypoxie na diferenciaci apoplastických bariér v kořeni cibule (Experiment 2).....	69
10.3 Analýza exprese genů <i>ZmCASP</i> u kukuřice (Experiment 3).....	71
10.3.1 Anatomická analýza nodálních kořenů	71
10.3.2 Ověření detekce cílové sekvence <i>ZmCASP1</i> a <i>ZmCASP2</i>	73
10.3.3 Exprese genů <i>ZmCASP</i> v segmentech nodálních kořenů	74
10.3.4 Korelace exprese genů <i>ZmCASP</i> s anatomickou analýzou kořenů	77
11. Diskuze.....	78
11.1 Vliv toxicity kadmia na růst primárního kořene kukuřice	78
11.2 Apoplastické bariéry v kořenech pod vlivem kadmia	80
11.2.1 Kadmium posílilo diferenciaci apoplastických bariér	80
11.2.2 Rozdíly mezi hlavním kořenem a postranními kořeny	82
11.3 Propustnost apoplastu.....	83
11.4 Molekulární mechanismy diferenciace exodermis.....	85
11.4.1 Exprese <i>ZmCASP1</i> a <i>ZmCASP2</i> v kořenech kukuřice	85
11.4.2 Další pokračování experimentální práce	86
12. Závěr.....	88
13. Seznam použité literatury	89

4. Abstrakt

Řada prací na různých rostlinných druzích ukázala, že nepříznivé podmínky prostředí ovlivňují diferenciaci apoplastických bariér (endodermis a exodermis) v kořeni. Exodermální vrstva vykazuje větší variabilitu v odpovědi na stresové podmínky. Vliv toxicity kadmia, podobně jako jiné druhy stresových faktorů, urychluje ukládání apoplastických bariér. Většina publikovaných informací nicméně doposud analyzovala především odpověď hlavní osy kořene. Postranní kořeny, které tvoří hlavní část absorpční plochy kořenového systému, jsou opomíjeny a existuje jen velmi málo informací o plasticitě vývoje jejich apoplastických bariér, především exodermis. Charakter ukládání apoplastických bariér byl proto zkoumán u různých typů kořenů kukuřice – hlavních i postranních různé délky a pozice na hlavní ose kořene. Byly zachyceny podstatné rozdíly, které od sebe jednotlivé typy kořenů v odpovědi na působení kadmia odlišovaly. Krátké postranní kořeny reagovaly citlivěji na přítomnost kadmia, ovlivněno bylo větvení kořene i diferenciaci bariér v postranních kořenech. Tyto výsledky poskytují lepší představu o variabilitě odpovědi v rámci komplexního kořenového systému tvořeného kořeny různé velikosti. V druhé části práce byla analyzována role CASP genů ve vývoji exodermální vrstvy u kukuřice. CASP proteiny byly popsány u *Arabidopsis thaliana* jako proteiny, které se podílí na vzniku Casparyho proužku, prvního kroku při ukládání apoplastické bariéry. O exodermis v tomto směru zatím není nic známo. Náš výzkum byl proto prováděn na rostlinách kukuřice, neboť u ní dochází k diferenciaci exodermální vrstvy a byla detekována exprese ortologů CASP genů (ZmCASP1 a ZmCASP2) v nodálních kořenech. Výsledky naznačují, že se zapojují i při vzniku Casparyho proužků v exodermis. Postup vývoje obou apoplastických bariér reflektuje spíše ZmCASP1, jehož exprese dobře koreluje s nástupem lignifikace Casparyho proužku v exodermální i endodermální vrstvě. U ZmCASP2 výsledky naznačují spíše jeho konstitutivní expresi.

Klíčová slova: exodermis, Casparyho proužek, postranní kořeny, suberinové lamely, apoplastické bariéry, CASP

5. Abstract

Environmental conditions affect the formation of apoplastic barriers (endodermis and exodermis) in roots. This was shown on many species in many research papers. The exodermal layer is more variable in response to stress conditions than endodermal layer. Cadmium toxicity, as many other stresses, induces faster development of apoplastic barriers. Most of research papers published so far, however characterized only the response of main root to this type of stress factor. Lateral roots, an important part of the root system absorptive surface, are neglected and there is not much information about their response to cadmium stress. The pattern of apoplastic barriers development was therefore analysed in main and also in lateral roots of various size and position on maternal root axis. We found significant differences in response to cadmium stress among these different root types. Then we summed up the differences between these types of roots. Short lateral roots were generally more responsive to cadmium stress, cadmium affected root branching as well as differentiation of apoplastic barriers in lateral roots. These results help us to better understand the response of complex roots system to environmental conditions. In the second part of this work, the role of CASP genes in exodermal development was analysed. It is already known, that CASP genes play role in endodermal Casparian strip development, which was described for *Arabidopsis thaliana*. Our model plant was maize, because it forms also exodermal layer and the orthologues of CASP genes for maize (ZmCASP and ZmCASP) were found. Our results show, that CASP genes may also play some role in exodermal Casparian strip development. ZmCASP1 expression correlates with Casparian strip lignification in endodermis and exodermis. ZmCASP2 expression seems to be more constitutive.

Key words: exodermis, Casparian strip, lateral roots, suberin lamellae, apoplastic barriers, CASP

6. Seznam zkratek

βTUB	β - tubulin
CASP	Casparian strip membrane domain protein
CASPL	CASP – like protein
CSD	Casparian strip membrane domain
EF1a	Elongation factor 1 alfa
ESB1	Enhanced suberin 1
FM4-64	(N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide)
GRAS	GRAS domain protein
JKD	JACKDAW
LSI	Low silicon rice
MGP	MAGPIE
MYB36	MYB DOMAIN PROTEIN 36
PEG	polyetylenglykol
PER64	Peroxidáza 64
PI	propidium jodid
PTS	8 - hydroxy - 1,3,6 - pyrenetrisulphonate
RBOHF	Respiratory burst oxidase homolog F
ROL	radial oxygen loss (radiální ztráty kyslíku)
SCL23	SCARECROW–like 23
SCR	SCARECROW
SHR	SHORT-ROOT
UPF	Uncharacterized protein family

7. Úvod

Tato diplomová práce zčásti navazuje na bakalářskou práci zabývající se změnami ve vývoji apoplastických bariér při různých podmínkách prostředí. Obě tyto práce byly vypracovány v laboratoři Fyziologické anatomie rostlin.

Specifické vrstvy buněk tvoří v kořeni apoplastické bariéry – endodermis a exodermis. Plní důležitou regulační úlohu při vstupu látek do kořene. Zatímco endodermis je obligátní struktura v kořenech cévnatých rostlin, exodermis nenajdeme u všech rostlinných druhů (chybí např. u rostlin nahosemenných nebo cévnatých výtrusných). Exodermální vrstva také projevuje větší variabilitu ve svém vývoji v reakcích na změny prostředí a představuje proto důležitou ochrannou vrstvu, která ovlivňuje pohyb látek mezi primární kůrou kořene a rhizosférou (Enstone et al. 2003). Zároveň je ve výzkumu více opomíjena. Výzkum byl soustředěn především na ni.

V rámci projektu COST (projekt LD11017, Apoplastické bariéry v interakci rostliny s půdním prostředím) byla část práce soustředěna na kadmium, jeho vliv na růst kořenů a jejich větvení, a zejména na vývoj apoplastických bariér, tj. ovlivnění jejich vzniku a funkce. S tímto těžkým kovem je problém celosvětově, protože dochází ke kontaminaci zemědělských půd. Z nich se právě skrze rostliny dostává do potravního řetězce, jelikož se ukládá především v nadzemních částech rostlin, tudíž i v plodech. Tak dochází k jeho hromadění v těle člověka i zvířat. Ke kontaminaci půd těžkými kovy bohužel přispívají především antropogenní činnosti (Shallari et al. 1998; Herawati et al. 2000; Nagajyoti et al. 2010). Studie zabývající se vlivem Cd na kořenový systém rostlin ukazují, že dochází k urychlení diferenciaci endodermis i exodermis (Lux et al. 2011). Tyto práce se však až na výjimky vždy soustředily pouze na odpověď hlavní osy kořene. Neméně důležitou součástí kořenového systému jsou však i kořeny postranní. O postranních kořenech je v tomto ohledu jen minimum dostupných informací (Soukup et al. 2002; Faiyue et al. 2010). I proto bylo hlavním cílem tohoto projektu srovnání odpovědi hlavní osy na Cd s odpovědí kořenů postranních na kukuřici (*Zea mays L.*) jako modelové rostlině. V rámci projektu byly také analyzovány další typy stresů (např. salinita, hypoxie). Tyto výsledky nejsou přímo součástí diplomové práce, budou však zohledněny v diskuzi výsledků.

Vzhledem k významné roli apoplastických bariér bylo dalším cílem práce začít odkrývat způsob jejich vzniku na molekulární úrovni. Hlavním výchozím bodem pro náš výzkum jsou články z laboratoře Nika Geldnera (Department of Plant Molecular Biology, Univerzita v Lausanne, Švýcarsko). Ty se věnují proteinům, které se v *Arabidopsis thaliana* podílí na vzniku

Casparyho proužků v endodermis (Alassimone et al. 2010; Roppolo et al. 2011; Alassimone et al. 2012; Roppolo et al. 2014). Již bylo odhaleno několik molekulárních hráčů, kteří se na vzniku apoplastických bariér v endodermis podílejí. Středem našeho zájmu jsou proteiny z rodiny CASP (Casparian strip membrane domain protein), které se podílejí na vzniku membránové domény Casparyho proužku v endodermis (CSD; Casparian strip membrane domain). Tato doména tvoří jakési lešení pro správné uložení Casparyho proužku (Roppolo et al. 2011). Do samotného vývoje endodermis a regulace jejího vzniku jsou zapojeny transkripční faktory SHR (SHORT-ROOT), SCR (SCARECROW) a MYB36 (MYB DOMAIN PROTEIN 36). Ty jsou zapojeny do regulační dráhy, která ovlivňuje i funkci CASP proteinů (Di Laurenzio et al. 1996; Helariutta et al. 2000; Kamiya et al. 2015; Liberman et al. 2015).

Všechna dosavadní zjištění platí pouze pro endodermální vrstvu. Do jaké míry jsou platné také pro vývoj exodermis, není v tuto chvíli jasné. Naše práce je proto prováděna na modelovém organismu *Zea mays L.*, neboť tato rostlina na rozdíl od *Arabidopsis* tvoří i exodermální vrstvu. Zde chceme osvětlit roli a zapojení *CASP* genů právě ve vrstvě exodermální. Pro práci byly vybrány dva ortology *CASP* genů u kukuřice dle (Roppolo et al. 2014) – *ZmCASP1* (B6T959) a *ZmCASP2* (B6U045). Oba vykazují vysokou míru exprese v kořenech (blíže viz kapitola 8.4.9).

7.1 Cíle práce

Z úvodu vyplývají hlavní cíle práce, které jsou:

1. Analyzovat vliv toxicity kadmia na kořenový systém kukuřice

- morfologie primárního kořene (délka, větvení)
- rozsah diferenciací apoplastických bariér
 - srovnat reakci hlavní osy kořene a postranních kořenů
 - porovnat výsledky s jiným rostlinným druhem, případně jiným typem stresu

2. Na molekulární úrovni porovnat vývoj exodermis s vývojem endodermis

- analyzovat zapojení vybraných genů s již známou rolí ve vývoji endodermis (geny rodiny *CASP*) ve vývoji exodermální vrstvy u kukuřice

8. Přehled literatury

Kořen tvoří významnou část rostlinného těla. Je branou pro minerální látky, ale i polutanty. Tyto se mohou do rostliny dostávat dvěma cestami – apoplastickou a symplastickou. Zatímco symplastickou cestu, zahrnující kontinuum cytoplasmy sousedících buněk, může rostlina lépe regulovat díky vstupu látek přes plasmatickou membránu do buňky, apoplastická cesta prostorem buněčných stěn je regulovatelná hůře. K tomuto účelu rostliny vytváří tzv. apoplastické bariéry. Ty napomáhají tomu, že je apoplastická cesta vstupu látek do rostlin nějakým způsobem regulována.

8.1 Apoplastické bariéry

Jako apoplastické bariéry jsou vnímány specifické vrstvy buněk v kořeni, které se nazývají endodermis a exodermis. Svou přítomností ovlivňují a regulují propustnost apoplastu. Buňky endodermis a exodermis jsou typické přítomností Casparyho proužků. Dále může následovat uložení suberinové lamely a terciární stěny (Kroemer 1903; Hose et al. 2001; Ma a Peterson 2003; Enstone et al. 2003; Geldner 2013). Bariéry obecně regulují příjem vody, minerálních látek, ale i polutantů. Fungují oběma směry: jak při bránění vstupu látek do kořene, tak proti jejich úniku ven z kořene (Steudle a Peterson 1998). Funkce bariér byla pěkně doložena různými přístupy. Jedním z nich je použití apoplastické sondy (traceru), látky, která se po aplikaci do okolí kořene pohybuje apoplastem směrem do jeho vnitřních pletiv, a její pohyb je následně detekován (Pecková et al., v tisku; de Lavison 1910; Soukup et al. 2002; Ranathunge et al. 2005a; Ranathunge et al. 2005b; Naseer et al. 2012; Hosmani et al. 2013). Např. Aloni et al. (1998) s pomocí apoplastické sondy ukázali, kde v kořenech několika jednoděložných a dvouděložných rostlin dojde k zastavení této sondy. Z berberinu, který pronikal do nitra kořene, vytvořili sraženinu přidáním thiokyanatanu draselného. Sraženinu bylo možné na řezech snadno detekovat a díky tomu viděli, že u rostlin s exodermální vrstvou (vyvinuté Casparyho proužky v hypodermální vrstvě buněk), se sonda zastavila již v hypodermální vrstvě. U rostlin pouze s endodermální vrstvou se sonda zastavila až v primární kůře. Dalšími metodami jsou takové, které umožňují měřit hydraulickou vodivost kořene. K tomu slouží měření např. pomocí tlakových sond (Zimmermann a Steudle 1998; Ranathunge et al. 2005a; Ranathunge et al. 2005b) či postupné vytváření vakua v kořenech (Knipfer a Fricke 2010). Propustnost apoplastických bariér pro plyny se měří pomocí kyslíkové mikroelektrody, která detekuje koncentraci kyslíku v pletivech kořene a umožňuje vyhodnotit propustnost bariér pro kyslík (Armstrong a Armstrong 2001; Soukup et al. 2007). Celkově se

propustnost apoplastu mění během růstu kořene, kdy dochází k ukládání ligninu a postupnému vývoji bariér (Clarkson 1993).

8.2 Vývoj apoplastických bariér

8.2.1 Endodermis

Tato buněčná vrstva je vnitřní vrstvou primární kůry. Nachází se tedy na pomezí primární kůry a středního válce, které od sebe odděluje. Vyvíjí se velmi blízko kořenové špičce (Ma a Peterson 2003; Lux et al. 2004; Meyer et al. 2009; Alassimone et al. 2010). Její buňky jsou na rozdíl od exodermis uniformní, nijak se od sebe vzhledově neliší (Zeier a Schreiber 1998; Hose et al. 2001; Enstone et al. 2003). Mezi buňkami této vrstvy se nevyskytují mezibuněčné prostory. Její role v regulaci příjmu látek dále do rostliny je velmi důležitá. Najdeme ji u všech cévnatých rostlin (Enstone et al. 2003) s jedinou výjimkou u plavuní (*Lycopodium*), kde nebyla typická endodermis s Casparyho proužky detekována (Damus et al. 1997). Endodermis je považována za hlavní apoplastickou bariéru. Proto je evolučně dobře konzervována. Velkou roli v její funkci hraje i polarita membrány, tj. polarizovaný výskyt membránových transportérů, který umožňuje směrovaný tok látek přes endodermální buňky (Alassimone et al. 2010; Takano et al. 2010).

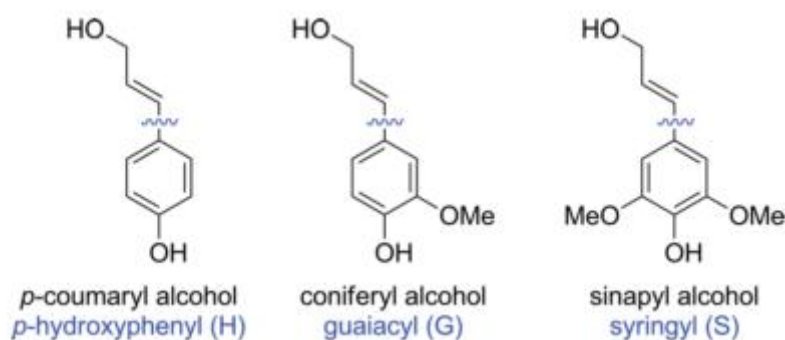
Vývoj apoplastických bariér zahrnuje tři kroky modifikací buněčné stěny, ne vždy ale ke všem třem

krokům

dochází.

Prvním krokem ve vývoji bariéry je uložení Casparyho proužků. Casparyho proužek je vlastně impregnace buněčné stěny. Může se vyskytovat ve formě dvou teček, vzájemně od sebe oddělených, typicky má ale podobu souvislého proužku a může zabírat polovinu až tři čtvrtiny radiální stěny (Enstone et al. 2003; Ma a Peterson 2003). Prochází středem radiálních a transversálních stěn, a jako pásek obtáčí buňku (Caspary 1865; Kroemer 1903; Van Fleet 1961; Schreiber et al. 1999; Geldner 2013). Při plazmolýze zůstává protoplast v místě Casparyho proužků spojen s buněčnou stěnou (Haas a Carothers 1975; Karahara et al. 2004; Geldner 2013). Už od počátku minulého století se vědci snažili přijít na to, zda se Casparyho proužky skládají pouze z ligninu, či v jejich stavbě hraje roli i suberin. Fenolický biopolymer lignin je bezpochyby dominantní složkou Casparyho proužků (Campbell a Sederoff 1996; Zeier a Schreiber 1997; Zeier a Schreiber 1998; Naseer et al. 2012). U některých rostlin byl ale alespoň v malém množství detekován i suberin (Schreiber et al. 1999). Lignin je důležitý především pro mechanickou oporu rostliny, příjem vody či ochranu rostliny. Je odvozen od L-fenylalaninu. Jeho třemi základními složkami jsou monolignoly (alkoholy odvozené od kyseliny skořicové):

p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol. Mají aromatická jádra a jejich polymerací vzniká lignin (Obr. 8.1). Z monolignolů vznikají podjednotky ligninu (*p*-hydroxyfenyl, guaiacyl a syringyl), jejichž poměr určuje vlastnosti ligninu (Campbell a Sederoff 1996; Boerjan et al. 2003). Obecně vyšší obsah ligninu se nacházel v Casparyho proužcích jednoděložných rostlin (*Clivia miniata*, *Monstera deliciosa*) v porovnání s dvouděložnými (*Pisum sativum*) (Schreiber et al. 1999).



Obr. 8.1: Tři základní monolignoly a podjednotky, které z nich vznikají (modře oddělené): *p*-kumarylalkohol (*p*-hydroxyfenyl), koniferylalkohol (guaiacyl) a sinapylalkohol (syringyl). Převzato z (Pinkert et al. 2011).

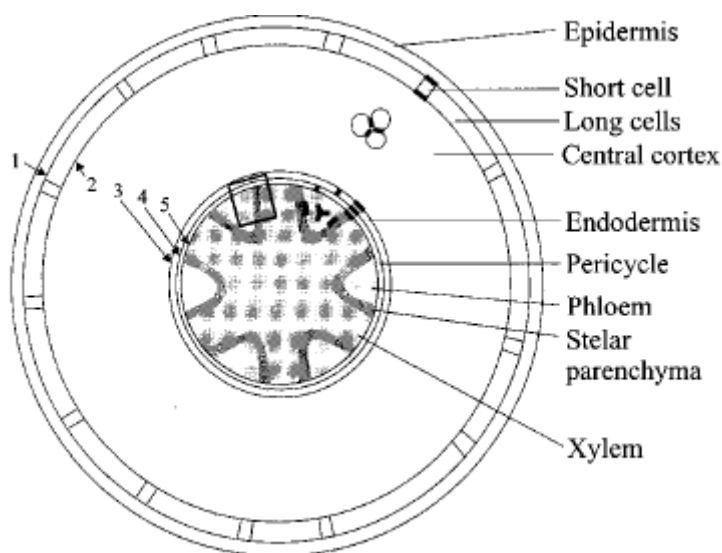
Uložení suberinových lamel je druhým stupněm vývoje apoplastických bariér. Suberinové lamely nejsou asociovány k plasmalemě jako Casparyho proužky, což bylo dokázáno plazmolýzou u kukuřice (Haas a Carothers 1975). Charakteristický vzhled lamel patrný na snímcích z elektronového mikroskopu se vyznačuje střídáním světlých a tmavých pásů. Tento vzhled souvisí se složením suberinu, kterým jsou lamely tvořeny. Biopolymer suberin se v nich vyskytuje ve formě střídajících se polyaromatických a polyalifatických domén (Bernards 2002; Graça a Santos 2007; Franke a Schreiber 2007; Geldner 2013; Vishwanath et al. 2015). Na míru suberinizace mají vliv i okolní podmínky prostředí (Zimmermann et al. 2000; Hose et al. 2001). Uložení suberinových lamel redukuje přístupnost membrány endodermální buňky látkám přítomným v apoplastu (Barberon a Geldner 2014; Barberon et al. 2016). Propustné buňky, u nichž je suberinizace opožděna, se v endodermis často nacházejí naproti xylémovým pólům, což naznačuje jejich význam v transportu látek (Peterson a Enstone 1996; Kotula et al. 2009). U exodermální vrstvy toto určení pozice vůči jiným pletivům pozorováno nebylo (Peterson a Enstone 1996; Hose et al. 2001). Právě suberin je klíčovou látkou, která významně přispívá k regulaci transportu rozpuštěných látek do rostliny (Franke a Schreiber 2007).

Třetím krokem vývoje bariér je uložení sekundární buněčné stěny. Často má podobu písmene U, proto o tomto kroku můžeme hovořit také jako o vzniku tzv. U-ztlustlin. Tato vrstva má především mechanickou a opornou funkci. Vyskytuje se převážně u jednoděložných rostlin, u většiny dvouděložných k jejímu ukládání nedochází (Esau 1953). Sekundární stěny U-ztlustlin jsou tvořeny především celulosou. Mohou být lignifikovány, složení ligninu se podobá ligninu v CP jednoděložných (Zeier a Schreiber 1998; Schreiber et al. 1999). Suberin se v sekundární stěně většinou vůbec, pokud ano, tak v zanedbatelném množství (Zeier a Schreiber 1998; Zeier et al. 1999). Suberin je přítomen spíše pouze v suberinových lamelách, což bylo ukázáno u několika jednoděložných rostlin (*Iris germanica*, *Aspidistra elatior*, *Agapanthus africanus*).

8.2.2 Exodermis

Druhou vrstvou, která funguje jako apoplastická bariéra v kořeni je exodermis. Exodermis je vlastně vnější vrstva primární kůry (hypodermální vrstva) s vyvinutými Casparyho proužky, případně dalšími stadii vývoje bariér. Je vrstvou, která reguluje vstup látek do vnitřního prostoru primární kůry kořene. Na rozdíl od endodermální vrstvy se v kořeni většinou diferencuje dále za kořenovou špičku (Ma a Peterson 2003), i když tato sekvence se může za určitých podmínek obrátit (Zimmermann a Steudle 1998; Soukup et al. 2002; Meyer et al. 2009). Její postup diferenciací je více variabilní a neřídka je ovlivněn vnějšími podmínkami prostředí (Peterson a Perumalla 1990; Hose et al. 2001; Lux et al. 2011). Ačkoli jí není věnováno tolik pozornosti jako endodermis, vyskytuje se u rostlin hojně. Z 200 zkoumaných krytosemenných rostlin asi 80% mělo vyvinuté Casparyho proužky v hypodermální vrstvě (Ma a Peterson 2003; Perumalla et al. 1990; Hose et al. 2001; Lehmann et al. 2000). Chybí však zřejmě u nahosemenných (Brundrett et al. 1990) a mezi cévnatými výtrusnými byla popsána pouze u některých zástupců rodu *Selaginella* (Damus et al. 1997). Bylo pozorováno, že exodermální vrstva se může v rostlinách vyskytovat ve dvou formách. První formou je uniformní exodermis. U tohoto typu dochází v sekundárním stadiu vývoje k suberinizaci všech buněk vrstvy bariéry. Může být tvořen jen jednou vrstvou buněk, jak je tomu např. u kukuřice *Zea mays* či slunečnice *Helianthus annuus*. Někdy může být i vícevrstevná jako např. u ananasovníku *Ananassa macrodontes* (Hose et al. 2001). Druhým typem je exodermis dimorfní. Zde dochází k tvarovému odlišení buněk, které vrstvu tvoří. Tento typ najdeme např. u cibule *Allium cepa* či chřestu *Asparagus officinalis* (Esau 1953; von Guttenberg 1968). Ve vrstvě se jednak nacházejí dlouhé, suberinizované buňky a buňky krátké, u nichž je suberinizace zpožděna či k ní vůbec nedochází (Peterson a Enstone 1996; Hose et al. 2001; Enstone et al. 2003). Pozice krátkých a dlouhých buněk není nijak určena pozicí vůči

ostatním pletivům kořene (von Guttenberg 1968; Peterson a Enstone 1996). Krátké buňky pravděpodobně mají funkci propustnou (Peterson a Enstone 1996). Přes tyto buňky zřejmě dochází k symplastickému transportu. U cibule zůstávají funkční plasmodesmy právě v krátkých buňkách. V dlouhých buňkách dochází k uložení suberinových lamel a k jejich symplastické izolaci (Ma a Peterson 2000; Ma a Peterson 2001) (Obr.8.2).



Obr. 8.2: Řez kořenem cibule *Allium cepa* znázorňující jednotlivé vrstvy kořene včetně apoplastických bariér endodermis a exodermis. Ve vrstvě exodermis jsou naznačeny krátké a dlouhé buňky. Převzato z (Ma a Peterson 2001).

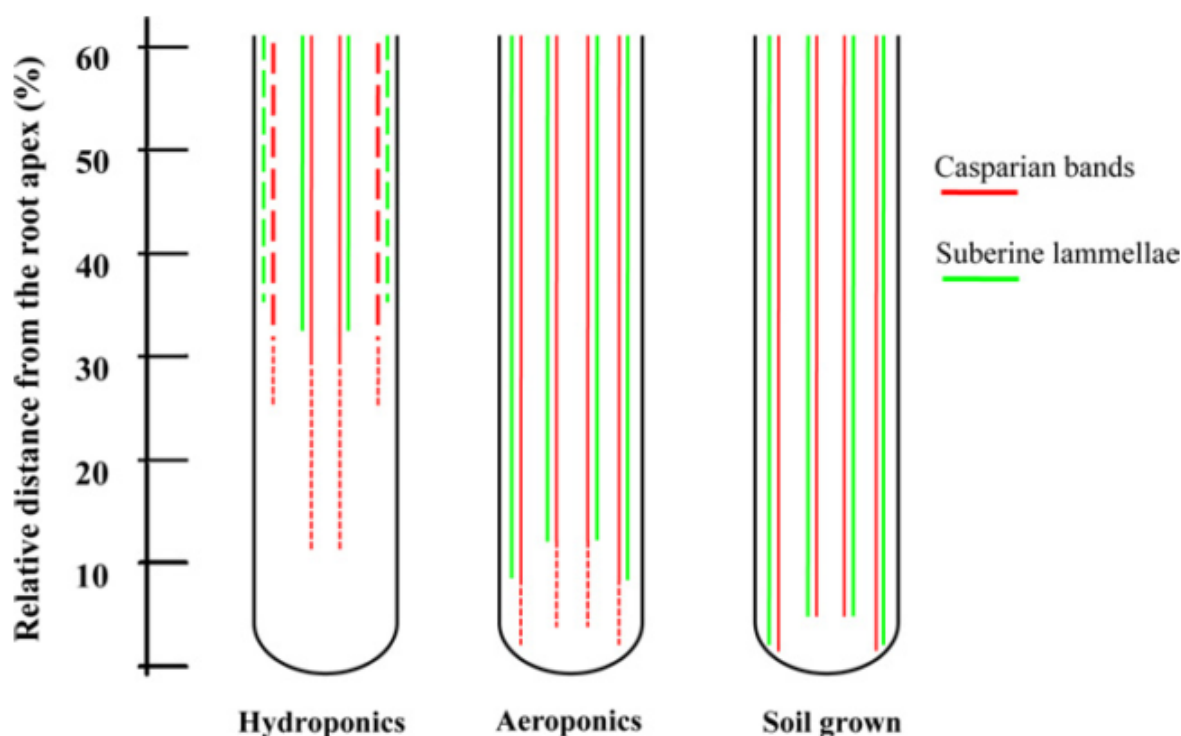
8.3 Plasticita vývoje bariér v odpovědi na podmínky prostředí

Kořeny si vytvořily mnoho strategií, jak reagovat na podmínky okolního prostředí a případné stresové faktory (Reinhardt a Rost 1995; Degenhardt a Gimmler 2000; Hose et al. 2001; Karahara et al. 2004; Vaculík et al. 2009; Lux et al. 2011). Jak již bylo zmíněno, apoplastické bariéry jsou jednou z těchto významných adaptací. Především v mnoha případech dochází k urychlení ukládání apoplastických bariér v přítomnosti stresových faktorů (Karahara et al. 2004; Armstrong a Armstrong 2005; Soukup et al. 2007; Lux et al. 2011). V tomto ohledu se jeví významnější vrstva exodermální, která na podmínky prostředí variabilněji reaguje (Hose et al. 2001).

Rozsah diferenciac bariér následně ovlivňuje transportní vlastnosti kořene. Příkladem může být srovnání rostlin kukuřice pěstovaných za různých podmínek – v hydroponii, aeroponii (kořeny pouze mlženy) a půdě (Zimmermann a Steudle 1998; Redjala et al. 2011). V aeroponii dochází k výraznějšímu a urychlenému vývoji apoplastických bariér. Kukuřice pěstované v hydroponii exodermis neměly, ty z aeroponie (pouze mlženy) vyvinutou exodermis měly

(Zimmermann a Steudle 1998). V aeroponii, jak bylo pozorováno opět u kukuřice, dochází k výraznějšímu a urychlenému vývoji apoplastických bariér. V hydroponii je jejich vývoj pomalejší (Redjala et al. 2011). Obecně je vývoj bariér v aeroponii svým charakterem bližší kořenům rostoucím v půdě (Obr. 8.3). Větší rozsah diferenciací bariér pak prokazatelně snižuje např. hydraulickou vodivost kořene (Zimmermann a Steudle 1998) nebo vstup polutantů (kadmia) do vnitřních pletiv rostliny (Redjala et al. 2011).

Nejvýznamnější stresové faktory, které postup diferenciací apoplastických bariér v kořeni ovlivňují, jsou shrnuty v následujících kapitolách.



Obr.8.3: Schéma ukazuje vývoj apoplastických bariér v kořenech kukuřice. Je zde porovnán charakter jejich vývoje v různých podmínkách kultivace: v hydroponii, aeroponii a v půdě. Exodermis je vrstvou blíže krajům kořene, endodermis se nachází uprostřed kořene. Vyvinuté Caspariovy proužky jsou znázorněny nepřerušovanou červenou čarou, vyvinuté suberinové lamely nepřerušovanou zelenou čarou. Přerušovaná čára znamená oblast, kde ještě není daná struktura vyvinuta ve všech buňkách endodermální nebo exodermální vrstvy. Převzato z (Redjala et al. 2011).

8.3.1 Kadmium a další těžké kovy

Kontaminace půd těžkými kovy je jedním z velkých problémů dnešního světa. Bohužel největší podíl na tomto stavu půd mají právě lidé a jejich činnost (Cheng et al. 2012b). Přítomnost

těžkých kovů v půdě má často za následek omezení růstu rostlin (Lux et al. 2011; Cheng et al. 2012b).

Jedním z polutantů, který ohrožuje zemědělství, ale i naše zdraví, je kadmium (Cd). Do půdy se dostává především kvůli antropogenní činnosti jako průmyslový odpad či používáním fosfátových hnojiv kontaminovaných kadmiiem (Padmavathiamma a Li 2007; White a Brown 2010; Lux et al. 2011). Cd se apoplastem a symplastem dostává do rostliny a akumuluje se v pletivech, především ve stonku a plodech. Tímto způsobem se může dostávat do potravního řetězce a ohrožovat živočichy včetně člověka (Sanità di Toppi a Gabbrielli 1999; He et al. 2005). Existují různé způsoby, kterými se rostliny brání proti toxicitě Cd. Jedním z nejdůležitějších je chelatace Cd v cytoplasmě a jeho uložení do vakuol. Dalším je ukládání apoplastických bariér. Obě tyto strategie napomáhají redukcí příjmu Cd do xylému a jeho akumulace v nadzemní části (Lux et al. 2011). V poslední době jsou oblastí výzkumu i rostliny akumulující Cd, které by mohly pomoci dekontaminaci půd (Padmavathiamma a Li 2007). Přítomnost vyšší koncentrace Cd v rhizosféře ovlivňuje anatomické vlastnosti kořene. Dochází především k akceleraci vývoje apoplastických bariér. Dále dochází ke změnám ve velikosti buněk a kořenových pletiv (Lux et al. 2011; Seregin a Kozhevnikova 2011). Zvýšená koncentrace Cd zvyšuje i počet vznikajících kořenových vlásků, které se zároveň nacházejí i blíže kořenové špičce (Seregin a Ivanov 2001; Vitoria et al. 2003). Tato reakce je ale patrná jen v případě, že daná koncentrace Cd (závisí na druhu rostliny) zpomalí růst kořene zhruba o polovinu, a zřejmě tedy souvisí s pomalejším růstem kořenů a diferenciací pletiv blíže za kořenovou špičku. Vyšší koncentrace Cd počet kořenových vlásků snižují (Lux et al. 2011). U vrby *Salix alba* a topolu *Populus x euroamericana* cv. Robusta byla pozorována stejná odpověď na 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Došlo k poškození kořenových špiček, rhizodermis a primární kůry, také ke zkrácení elongační zóny kořenů či výskytu nepravidelně tvarovaných buněk (Lunáčková et al. 2004). Kořeny vystavené působení Cd bývají často kratší a tlustší (Lunáčková et al. 2004; Maksimović et al. 2007).

Výraznou změnou, kterou Cd v kořenech rostlin způsobuje, je urychlení vývoje apoplastických bariér. To bylo zdokumentováno např. u kukuřice *Zea mays*. Po nerovnoměrném působení, tzn. jen z jedné strany kořene, byl patrný i nerovnoměrný stupeň suberinizace endodermis. Kořeny rostlin byly umístěny mezi dvě vrstvy agaru, kdy jedna obsahovala Cd (50 či 100 μmol $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a druhá Cd neobsahovala. Působením Cd došlo k urychlenému vývoji endodermis v polovině kořene, která mu byla přímo vystavena. Na straně vystavené Cd došlo k uložení suberinových lamel již 0,5 cm od kořenové špičky. V neovlivněné části kořene se

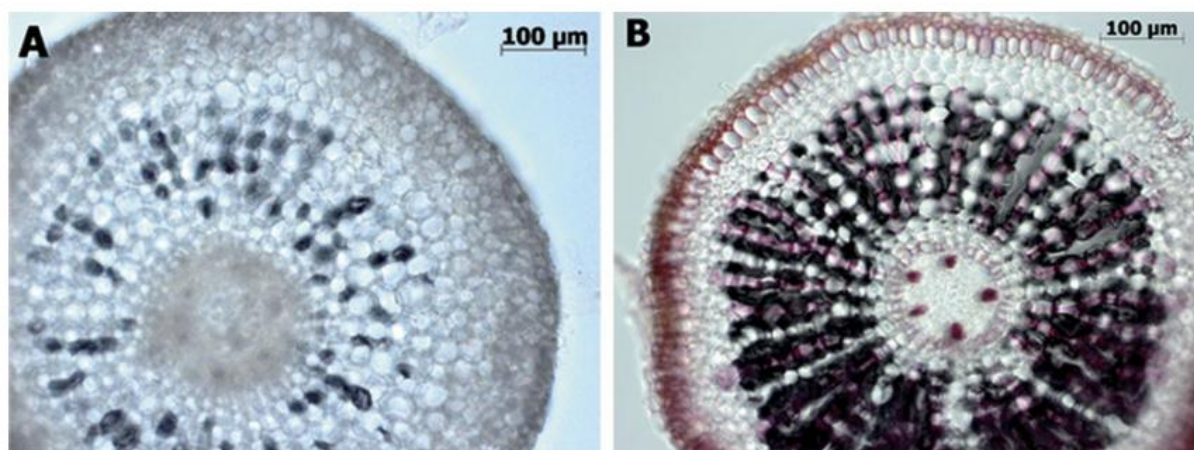
lamel začaly zakládat 1 cm od špičky, plně diferencovány byly až ve vzdálenosti 2 cm od špičky (Lux et al. 2011). Vliv podmínek prostředí byl patrný v porovnání dvou klonů vrby jívy *Salix caprea*. Jeden klon pocházel z kontaminované oblasti a byl schopen lépe akumulovat Zn i Cd. Druhý klon pocházel z nekontaminované oblasti. V kontrolních podmínkách se tyto klony lišily ve vzorci ukládání Casparyho proužků. Dle očekávání se Casparyho proužky v klonu z nekontaminované oblasti uložily dříve v endodermis, ale u klonu z kontaminované oblasti se proužky dříve uložily v exodermis. Když byl klon z nekontaminované oblasti vystaven stresu (působení Cd, Zn i obou prvků zároveň), došlo u něj k urychlení ukládání Casparyho proužků.

To bylo důsledkem reakce na stresové působení (Vaculík et al. 2012a).

Rákos *Phragmites australis* po vystavení působení Cd vykazoval hlavně změny v lignifikaci. Jeho exodermální vrstva, jak u kontrolních, tak rostlin stresovaných 100 μM Cd, byla tvořena 3-4 vrstvami buněk. Tyto buňky měly tlusté stěny, ale jejich vzhled byl stejný u stresovaných i nestresovaných rostlin. U stresované varianty ale došlo k výrazné lignifikaci pokožky, exodermis i endodermis. Lignifikace proběhla blízko kořenové špičky (Ederli et al. 2004).

Kombinovanému stresu z přítomnosti těžkých kovů, zvýšené salinity a pH byly vystaveny rostliny kukuřice pěstované v půdě kontaminované odpadní struskou. Celkově byl růst jejich kořenů redukován, stejně tak jejich průměr. V endodermis došlo k uložení masivních U-ztlustlin. Celkově endodermis stresovaných rostlin obsahovala více ligninu a změnilo se i jeho složení, co se týče zastoupení podjednotek. Lignin obsahoval více p-hydroxyfenylových podjednotek, což poukazuje na stresové podmínky (Campbell a Sederoff 1996; Degenhardt a Gimmler 2000). Dalším fenoménem, který byl v tomto experimentu pozorován, byl vznik tzv. phi-ztlustlin v horní třetině stresovaných kořenů. Tato kombinace stresových faktorů pravděpodobně zapříčinila jejich vznik. Jedná se o modifikaci radiálních stěn buněk rhizodermis (např. u kukuřice - (Degenhardt a Gimmler 2000)) nebo buněk vnitřních vrstev primární kůry nad endodermis (např. u řepky – (Fernandez-Garcia et al. 2009)). Phi-ztlustliny se u kukuřice nenachází ve všech buňkách rhizodermis a nemají funkci apoplastické bariéry. Zřejmě mají funkci mechanickou. Jejich vzhled bývá nepravidelný a zvlněný. Při vývoji dochází velmi brzy k jejich lignifikaci, což bylo ověřeno barvením floroglucinolem (Haas et al. 1976). Jsou asociovány s mikrotubuly, které se nacházejí paralelně k delší ose phi-ztlustlin. Na rozdíl od Casparyho proužků u nich nedochází k asociaci s plasmalemou. Jejich vlastnosti byly pozorovány u pelargonie *Pelargonium hortorum*, kde se nacházely především v hypodermální vrstvě, ale i v primární kůře (Haas et al. 1976).

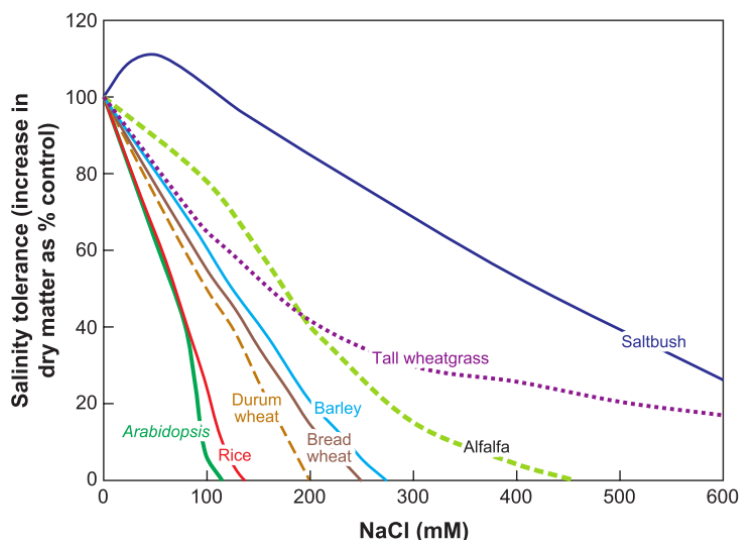
Nejen Cd, ale i další prvky ovlivňují vlastnosti kořenového systému a ukládání apoplastických bariér. Například vliv přítomnosti Cu byl pozorován u mangrovníků *Bruguiera gymnorrhiza* a *Rhizophora stylosa*. Se zaplavením, kterému jsou často vystaveny, je spojen nedostatek kyslíku. Mangrovníky byly vystaveny 100, 200, 300 a 400 mg/kg CuCl_2 . Efekt Cu se stupňoval s rostoucí koncentrací. U obou druhů zvýšená koncentrace Cu způsobila zesílení vnějších buněčných vrstev kořene. V exodermis, endodermis a středním válci došlo k výraznějšímu uložení ligninu a suberinu. Lignin způsobil, že byly omezeny radiální ztráty kyslíku z kořenů (ROL, radial oxygen loss). V endodermální vrstvě mangrovníků došlo ke klasickému urychlení uložení Casparyho proužků (Cheng et al. 2012b). Zároveň se po vystavení rostlin Cu snížila i propustnost jejich kořenů, jelikož lignifikace exodermis zafungovala jako bariéra pro její vstup a zároveň zamezila ROL (Cheng et al. 2012b). U 8 druhů mangrovníků (3 pionýrské, 3 „pravé“ mangrovníky – *Rhizophoraceae* a 2 polopevninské) byl zkoumán vliv 500 mg/kg Fe^{2+} , 100 mg/kg S^{2-} a 250 mg/kg Zn^{2+} . ROL se nejvíce snížily u pravých mangrovníků, jelikož se u nich uložila více lignifikovaná exodermis. To přispělo i k vyšší toleranci k Fe, S a Zn. Pionýrské druhy byly tolerantní nejméně. U pravého mangrovníku *Bruguiera gymnorrhiza* byla posílena signifikace v exodermis, primární kůře i středním válci (Obr.8.4). Jelikož se více lignifikovaná exodermis tvořila jako reakce na Fe či S, nedošetření těmito prvky mělo za následek zvýšení tolerance vůči vstupu Zn (Cheng et al. 2012a).



Obr. 8.4: Řezy kořenem *B.gymnorrhiza* v kontrolních podmínkách (A) a vystavených působení Fe (B), u nichž je patrný nárůst lignifikace. Řezy byly provedeny 1 cm od kořenové špičky, obarveny floroglucinolem s HCl pro detekci ligninu. Převzato z (Cheng et al. 2012a).

8.3.2 Salinita a osmotický stres

Zasolení půd je dalším velkým problémem, který rostliny sužuje. Vysoké koncentrace solí v půdě rostlinám ztěžují příjem vody. Když je vysoká koncentrace solí přímo v rostlině, stává se pro ni toxickou (Munns and Tester 2008). Rostliny se mezidruhově liší v míře tolerance zasolení (Obr. 8.5).



Obr.8.5: Na obrázku je patrné, jak se liší míra tolerance na zasolení mezi jednotlivými druhy (*Oryza sativa*, *Triticum turgidum ssp durum*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Thinopyrum ponticum*, syn. *Agropyron elongatum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa* a *Atriplex amnicola*). Převzato z (Munns and Tester 2008).

Na salinitu byly pozorovány opět reakce ve smyslu urychlení ukládání apoplastických bariér (Reinhardt a Rost 1995; Degenhardt a Gimmler 2000; Karahara et al. 2004; Cheng et al. 2012b). Tento stimulační efekt byl pozorován u kukuřice *Zea mays* (Karahara et al. 2004) a bavlníku *Gossypium hirsutum* (Reinhardt a Rost 1995), pěstovaných v nižší a vyšší koncentraci NaCl (100 mM a 200mM). U mladých kořenů bavlníku (5 dní) došlo k urychlení vývoje apoplastických bariér, ovšem v kořenech starších (14 dní) tento jev již pozorován nebyl. Endodermální vrstva více stresovaných rostlin (200 mM) obsahovala pouze málo propustných buněk. V exodermální vrstvě se efekt zasolení projevil ještě výrazněji. U kontrolních rostlin nebyla tato vrstva přítomna. Stejně tak u většiny rostlin z mírnějšího stupně zasolení (100 mM NaCl). Rostliny z 200 mM NaCl měly exodermis zcela diferencovanou takovou rychlostí, že nebylo možné odlišit primární a sekundární stadium diferenciacie (Reinhardt a Rost 1995). S rostoucí salinitou roste také šířka Casparyho proužků. Např. u kukuřice při působení NaCl endodermální Casparyho proužky zabíraly větší část radiálních stěn (Karahara et al. 2004).

U kukuřice pěstované v hydroponii bylo také pozorováno, že zvýšené zasolení (NaCl) i osmotický stres (vyvolaný přidavkem polyetylglykolu (PEG) jako nepenetrujícího osmotika) neměly vliv na chemické složení exodermis, avšak došlo ke zvýšení absolutního množství uloženého suberinu a ligninu (Shen et al. 2014). Efekt vyšší koncentrace NaCl byl zkoumán i u mangrovníků (Hwang a Chen 1995; Krishnamurthy et al. 2014). Působení vyšší koncentrace NaCl ovlivňuje i propustnost apoplastu. Mangrovník *Avicennia officinalis* byl vystaven 500 mM NaCl a následně byla sledována propustnost apoplastu pomocí sondy PTS. V endodermis stresovaných rostlin došlo oproti kontrole k urychlení ukládání Casparyho proužků (5 mm od špičky). Stejně tak v exodermis (10 mm od špičky), ta měla dokonce biseriátní charakter. Tyto anatomické změny způsobily snížení propustnosti apoplastu (Krishnamurthy et al. 2014). Urychlení tvorby apoplastických bariér bylo pozorováno u třech kultivarů rýže, lišících se tolerancí k zasolení (od tolerantního k citlivému). Vývoj endodermis byl u všech stresovaných rostlin (50 a 100 mM NaCl) urychlen. Rostliny se lišily pouze vůči kontrole. Exodermis se v kontrolních podmínkách uložila pouze u tolerantního kultivaru. Ve stresových podmínkách se exodermis vyvinula u tolerantního a citlivého kultivaru, ale lišila se charakterem. Casparyho proužky byly markantnější u tolerantního kultivaru, suberinové lamely se zase dřív uložily u kultivaru citlivého (Krishnamurthy et al. 2011). Význam apoplastických bariér při samotném vstupu NaCl do rostliny byl zkoumán u kosatce *Iris germanica*. Rostliny byly pěstovány v 40 mM koncentraci NaCl. Byla porovnávána hydraulická vodivost kořenů bez vyvinuté exodermis, s vyvinutou biseriátní exodermis a s biseriátní exodermis, která byla narušena. Hydraulická vodivost byla měřena v tlakové komoře a pomocí tlakové sondy. Jak se dalo předpokládat, s dokončeným vývojem biseriátní exodermis se vodivost výrazně snížila oproti částem s nevyvinutou exodermis a narušenou biseriátní exodermis (Meyer et al. 2011). Kukuřice pěstovaná při 100 mM NaCl v hydroponii vykazovala urychlení ukládání bariér. Terciární stadium endodermis bylo u stresovaných rostlin přítomno 85 mm od špičky. V kontrolních rostlinách až 95 mm od špičky. Zasolení mělo za následek, že došlo ke vzniku multiseriátní exodermis. Ta byla přítomna u stresovaných rostlin (100 mM NaCl) 30 – 40 mm od špičky, u kontroly až 95 mm od špičky. K suberinizaci exodermis došlo dříve než v endodermis. Především suberinové lamely zabraňují vstupu solí do rostliny.

8.3.3 Hypoxie a zaplavení

Dalším významným stresovým faktorem je zaplavení. S ním se zpravidla musí vypořádat rostliny rostoucí v mokřadech či zaplavovaných oblastech, ale může ovlivnit i zemědělskou půdu. Zaplavení půdy navozuje dva hlavní typy stresových podmínek – nedostatek kyslíku a přítomnost toxických redukovaných sloučenin v rhizosféře (Ponnamperuma 1984). V mokřadních rostlinách exodermis plní funkci bariéry proti ztrátám kyslíku z aerenchymu, ale zároveň tak snižuje hydraulickou vodivost kořene (Hose et al. 2001). Hypodermální vrstva hraje důležitou roli při omezování ztrát kyslíku do prostředí především u mokřadních rostlin (Armstrong et al. 2000; Soukup et al. 2002; Kotula a Steudle 2009). I tento stres má často za důsledek urychlení ukládání bariér. Právě u mokřadních rostlin bylo pozorováno rychlejší uložení exodermis oproti endodermis (Soukup et al. 2002). Exodermis umožňuje kořenům mokřadních rostlin snížit únik kyslíku (transportovaného aerenchymatickými kanály z nadzemní části) z kořenů do rhizosféry. Radiální ztráty kyslíku (ROL, radial oxygen loss) jsou proto u kořenů mokřadních rostlin největší v oblasti kořenové špičky a dále po kořenové ose klesají v korelaci s postupem diferenciací exodermis (Colmer 2003). Toto tvrzení podporují i další studie (Soukup et al. 2007), konkrétně u rákosu *Phragmites australis* (Soukup et al. 2002) a u rýže *Oryza sativa* (Armstrong a Armstrong 2005). U rýže byly měřeny ROL pomocí mikroelektrody, stejně jako u zblochanu *Glyceria maxima* a rákosu *Phragmites australis* (Armstrong a Armstrong 2005; Soukup et al. 2007). Ke snížení ROL u rýže došlo v apikální části adventivních kořenů především díky modifikacím hypodermální vrstvy a bylo výraznější u rostlin stresovaných toxicitou sulfidů, tj. vystavených 0,174 mM koncentraci sulfidu (Armstrong a Armstrong 2005). Rostliny rýže vykazovaly ROL v různých vzdálenostech podél osy adventivních kořenů i podle toho, zda byly pěstovány v provzdušňované či stagnantní hydroponii. U kořenů z hydroponie byly ROL nejvyšší 30 mm od kořenové špičky, u kořenů z hypoxie již 5 mm od kořenové špičky. To poukazuje na to, že hypoxické podmínky vedly k vytvoření silných bariér - exodermis. Tomu odpovídalo i rychlejší uložení Casparyho proužků a suberinových lamel (blíže kořenové špičce) v kořenech z hypoxie oproti kořenům z provzdušňované varianty (Kotula et al. 2009).

8.3.4 Nízký vodní potenciál a hospodaření s vodou

Jak už bylo uvedeno výše, přítomnost bariér ovlivňuje hydraulickou vodivost kořenů. Seminální kořeny kukuřice, které vyrostly v hydroponii a neměly vyvinutou exodermis, měly nižší hydraulickou vodivost než kořeny z aeroponie s diferencovanou exodermis (Zimmermann a Steudle 1998; Steudle a Peterson 1998). To dokládá, že exodermis je významnou bariérou

vodního toku rostlinou (Peterson et al. 1993; Steudle a Peterson 1998; Hose et al. 2000). U endodermis kukuřice bylo ověřeno, že hlavní bariéru pro prostupnost vody tvoří Casparyho proužky, ale suberinové lamely (Steudle a Peterson 1998). Exodermis se tedy významně podílí na regulaci příjmu a ztrát vody (Cruz et al. 1992; Taleisnik et al. 1999; Hose et al. 2000). U čiroku *Sorghum* pěstovaného v půdě s nízkým vodním potenciálem byly patrné rozdíly v lignifikaci endodermis a exodermis. V exodermis byly více lignifikovány vnější tangenciální stěny, u endodermis zase více vnitřní tangenciální stěny (Cruz et al. 1992; Taleisnik et al. 1999). Pomocí apoplastické sondy - Calcofluoru byla sledována i propustnost stresovaných kořenů čiroku. Ve vzdálenosti 10 mm od špičky byl Calcofluor zastaven na úrovni exodermis, až po penetraci této vrstvy jehlou se dostal skrz primární kůru až k endodermis. U kontrolních rostlin byla sonda zastavena exodermální vrstvou až 60 – 70 mm od kořenové špičky. Rostliny na stresový faktor reagovaly urychleným ukládáním exodermis, což podporuje tvrzení, že se jeví jako hlavní bariéra vstupu vody do kořene (Cruz et al. 1992). Exodermis je zároveň významnou bariérou proti ztrátám vody z kořene. To bylo ověřováno porovnáním druhů rostlin tvořících exodermis (kukuřice *Zea mays*, cibule *Allium cepa*, slunečnice *Helianthus annuus*) a druhů, které exodermis tvoří (hrách, bob). Ve všech kořenech byly ztráty vyšší v oblasti kořenové špičky než u báze kořene. Ale u rostlin s exodermální vrstvou byly celkově ztráty vody nižší (Taleisnik et al. 1999).

8.4 Molekulární mechanismy diferenciací endodermis

8.4.1 SHORT-ROOT a SCARECROW

Na regulaci vzniku a specifikaci endodermální vrstvy v kořeni se podílejí transkripční faktory SHR (SHORT-ROOT) a SCR (SCARECROW). Oba tyto transkripční faktory náleží do genové rodiny GRAS (Pysh et al. 1999; Helariutta et al. 2000), jsou důležité pro ustavení radiálního uspořádání kořene a pro asymetrické dělení iniciál primární kůry/endodermis (Helariutta et al. 2000).

Hlavním transkripčním faktorem, který se podílí na specifikaci endodermální vrstvy je SHR. Tento signál je zjevně dobře evolučně konzervován, jelikož není známo, že by některá rostlina měla více endodermálních vrstev než jednu. Signál se pohybuje z vnitřních pletiv středního válce, spouští asymetrické dělení buněk a specifikuje endodermální vrstvu (Di Laurenzio et al. 1996; Helariutta et al. 2000; Cui et al. 2007). Jeho funkce je předřazena funkci transkripčního faktoru SCR. Po použití specifických markerů v *Arabidopsis* se ukázalo, že mutanti *shr* ve vrstvě buněk mezi epidermis a pericyklem postrádaly znaky specifické pro endodermis. Vrstva

vykazovala znaky pouze pro primární kůru. To značí, že SHR je důležitý nejen pro dělení, ale i specifikaci endodermální vrstvy (Benfey et al. 1993; Helariutta et al. 2000). SHR je důležitý pro expresi *SCR*. To potvrdili mutanti *shr*, u nichž byla pozorována snížená exprese *SCR* v kořeni. Opačně tato závislost prokázána nebyla (Helariutta et al. 2000).

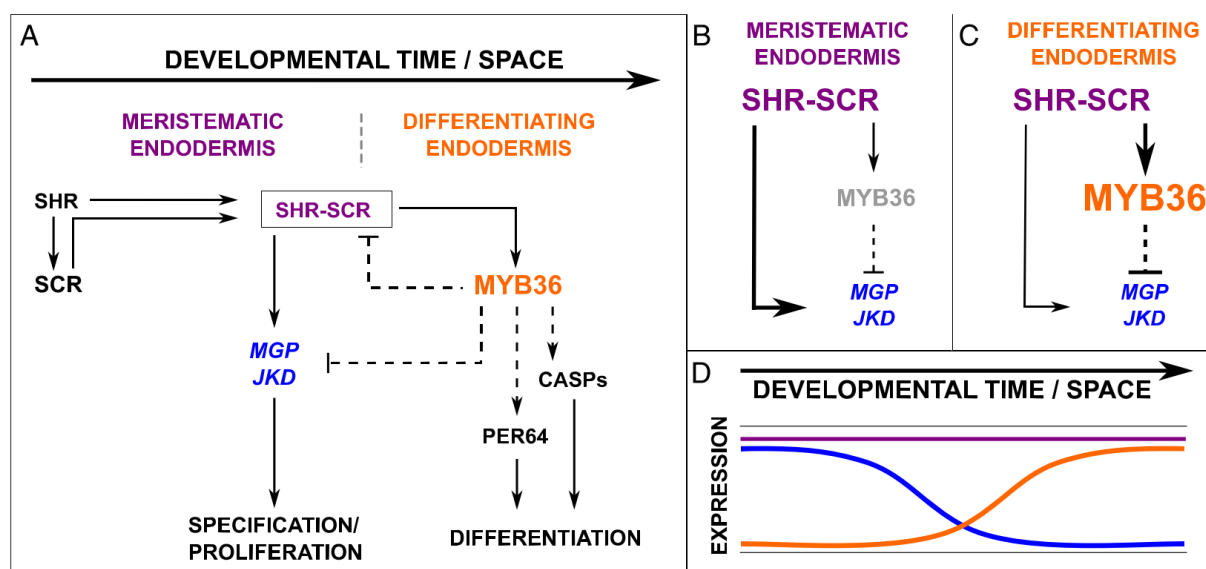
Transkripční faktor *SCR* je specificky exprimován v iniciálách primární kůry/endodermis a v endodermální buněčné linii. V komplexu *SHR-SCR* se podílí hlavně na regulaci asymetrického dělení buněk iniciál endodermis a primární kůry. U *Arabidopsis* bylo díky mutantům *scr* zjištěno, že s vyřazeným *SCR* se mezi epidermis a pericyklem nachází pouze jedna vrstva buněk. Organizace kořene je narušena a nedochází k rozdělení endodermis a primární kůry. Tento defekt byl pozorován i u postranních kořenů a kořenů regenerovaných z kalusu (Di Laurenzio et al. 1996). Bylo vysledováno, že tento defekt měl původ právě v narušení asymetrického dělení iniciály pro endodermis a primární kůru. U mutantních rostlin byly použity specifické markery pro endodermis a primární kůru. To ukázalo, že vrstva mezi epidermis a pericyklem měla vyvinuté vlastnosti obou těchto vrstev (Di Laurenzio et al. 1996). Funkce *SCR* byla testována i u kukuřice. U mutantů *scr* byla na rozdíl od *Arabidopsis* endodermis přítomna, ale ukládání Casparyho proužků bylo značně redukováno. Byla také prokázána role *SCR* ve vývoji pochev cévních svazků u C4 rostlin (věčité anatomie), konkrétně kukuřice. Mutanti *scr* kukuřice měli zmnožené buňky pochev cévních svazků a jejich vakuoly, narušenou diferenciaci chloroplastů v buňkách pochev cévních svazků, došlo k dezorientaci cév a redukcii jejich počtu (Slewinski et al. 2012).

SCL23 (*SCARECROW-LIKE23*) protein je proteinem z *GRAS* rodiny, který vykazuje homologii k *SCR* (Pysh et al. 1999; Helariutta et al. 2000). Tento mobilní protein se spolu s *SCR* podílí na regulaci vzniku endodermis, jak bylo pozorováno u *Arabidopsis*. *SCL23* zamezuje pohybu *SHR* mezi buňkami proto, aby docházelo ke vzniku pouze jedné vrstvy endodermálních buněk. Napomáhá tak funkci *SCR*, který tvoří proteinový komplex s *SHR* (Long et al. 2015). *SCL23* a *SCR* vzájemně antagonisticky regulují svou expresi. *SCL23* je exprimován v základním meristému, ale *SCL23* protein se vyskytuje i ve středním válci. Zřejmě se tedy pohybuje směrem ze základního meristému do středního válce. *SCL23* může ovlivnit množství *SCR* tím, že kontroluje akumulaci *SHR* (Long et al. 2015).

8.4.2 MYB DOMAIN PROTEIN 36

Další důležitý transkripční faktor, *MYB36* (*MYB DOMAIN PROTEIN 36*), se podílí na regulaci vzniku Casparyho proužků. *MYB36* přímo pozitivně reguluje expresi genů kódujících

CASP, PER64 a ESB1 proteiny (Kamiya et al. 2015; Liberman et al. 2015), které se podílejí na vzniku Casparyho proužků. MYB36 organizuje jejich expresi na správném místě a fázi vývoje kořene. Když je MYB36 vyřazen z funkce, nedochází ke správnému uložení ligninu během vzniku Casparyho proužků. Místo toho dochází pouze k ukládání materiálu podobného ligninu v rozích endodermálních buněk. MYB36 je exprimován v endodermálních buňkách v elongační a diferenciací zóně, slabý signál v meristematické zóně (Kamiya et al. 2015). SHR i SCR kontrolují aktivitu MYB36, SCR dokonce přímo (Liberman et al. 2015). Ukazuje se, že MYB36 zaujímá klíčové postavení v regulaci diferenciaci endodermis (Obr. 8.5). U mutanta *myb36-1* bylo pomocí apoplastické sondy propidium jodidu (PI) prokázáno zpomalení tvorby funkční endodermální bariéry – stejné jako je možné pozorovat u dvojitého mutanta *casp1/casp3*. Zároveň MYB36 potlačuje funkci genů kódujících zinc-finger proteiny JACKDAW (JKD) a MAGPIE (MGP), které regulují periklinální dělení v endodermis a primární kůře (Welch et al. 2007; Hassan et al. 2010; Ogasawara et al. 2011). Toto potlačení má za následek omezení proliferace a následnou diferenciaci endodermis.



Obr. 8.5 : Na obrázku je znázorněn postup od specifikace k diferenciaci endodermis. (A) Zde jsou popsány vztahy mezi jednotlivými hráči, kteří se podílejí na přechodu od proliferace k diferenciaci endodermis. (B) Pokud není exprimován MYB36, měla by být exprese genů MGP a JKD v meristému vysoká. (C) Zvýšená exprese MYB36 v zóně diferenciaci potlačuje expresi MGP a JKD. (D) Srovnání exprese MYB36 (oranžová) a JKD a MGP (modrá) v průběhu vývoje endodermis. Převzato z (Liberman et al. 2015).

8.4.3 Vznik a umístění Casparyho proužku

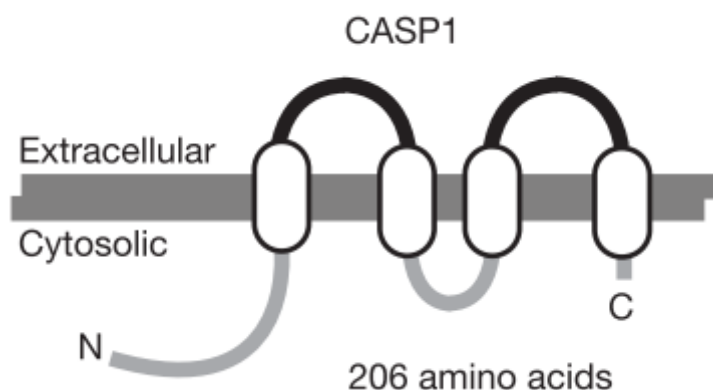
Casparyho proužek je struktura vznikající lokalizovanou impregnací primární buněčné stěny endodermální či exodermální buňky (Esau 1953). U huseníčku *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že tato impregnace zahrnuje především lignifikaci a při vývoji Casparyho proužků není potřebný suberin a dokonce není ani přítomen (Naseer et al. 2012). To je podpořeno i pozorováním (Haas a Carothers 1975), kteří u kukuřice pozorovali počátek suberinizace nejprve na vnitřních a vnějších tangenciálních stěnách buněk. Až poté došlo k suberinizaci radiálních stěn. Podíl suberinu na impregnaci Casparyho proužků však nelze zcela vyloučit u jiných rostlinných druhů (Zeier et al. 1999). Celkově se zdá, že specifikace místa a samotný vznik Casparyho proužku probíhá jako velmi rychlý sled událostí (Alassimone et al. 2010). Při vzniku Casparyho proužku dochází nejprve k určení místa, kam bude posléze uložen lignin. Toho se účastní specifické proteiny. Lokalizované depozici materiálu do buněčné stěny předchází vytvoření membránové domény Casparyho proužku (CSD; Casparian strip membrane domain). Tato doména umožní správnou lokalizaci enzymů podílejících se na depozici ligninu v buněčné stěně. CSD se nachází pod Casparyho proužkem a při plazmolýze zůstává asociována s buněčnou stěnou. Pomocí specifických markerů pro endodermální plasmatickou membránu Alassimone et al. (2010) prokázali, že při plazmolýze protoplast endodermálních buněk zůstává částečně přitíštěn k buněčné stěně až ve vzdálenosti 11,9 buněk po začátku elongace. To koresponduje se vzdáleností, kde jsou poprvé zaznamenány Casparyho proužky. Při tvorbě CSD a Casparyho proužků je využíván sekretorický transport. V epikotylech ve tmě rostoucích rostliněk hrachu (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) byl tento transport inhibován 200 μ M Brefeldinem A. V části kořene nad místem ošetření již oproti kontrole k vývoji Casparyho proužků nedošlo nebo byly nějak narušeny (Karahara a Shibaoka 1994).

8.4.4 CASP proteiny

Tyto proteiny specificky označují oblast membrány, nad kterou je posléze uložen Casparyho proužek. Podílejí se na založení CSD, kde pomáhají vytvářet lešení pro správné uložení proužku (Roppolo et al. 2011; Geldner 2013; Roppolo et al. 2014)

CASP geny byly nalezeny pomocí analýzy exprese genů specifických pro endodermis u huseníčku *A.thaliana* pomocí DNA čipů. Takto byly selektovány proteiny z rodiny UPF0497 (uncharacterized protein family). Proteiny této rodiny mají konzervované extracelulární smyčky a 4x procházejí membránou (Obr. 8.6). Reporterové linie ukázaly vysokou a specifickou transkripci právě v endodermální vrstvě. Lokalizace 5 vybraných proteinů této rodiny byla provedena pomocí fúze s GFP. Jejich lokalizace odpovídala pozici CSD. Jelikož

jsou prvními proteiny označujícími CSD, dostaly název CASP 1-5 (Casparian strip membrane domain proteins) (Roppolo et al. 2011). Protein CASP1 byl dále detailně sledován po fúzi s GFP. Signál byl viditelně přítomen ve stejném tvaru, který zaujímaly Casparyho proužky. Navíc označoval zónu, kde dochází k jeho přilnutí k plasmatické membráně. Dále bylo zjištěno, že transkripce *CASP1* předchází utváření CSD asi o vzdálenost 1-2 buněk. Také předchází vzniku Casparyho proužku přibližně o vzdálenost 2 – 4 buněk. Z toho je možné usoudit, že proteiny CASP předcházejí proces založení Casparyho proužku. CASP proteiny jsou tedy časné markery označující budoucí pozici CSD (Roppolo et al. 2011). Signál CASP1-GFP se stává více konkrétním ve chvíli, kdy je CSD formována. Lokalizace CASP1 v membráně endodermální buňky je nejprve difuzní, následně dochází k jeho akumulaci ve vznikající CSD. Tato akumulace je nejprve nespojitá, kdy vypadá jako „korálky na niti“ až po shluknutí ve tvaru budoucího Casparyho proužku. Při ektopické expresi byl signál CASP1-GFP viditelný v oblasti plasmatické membrány, což naznačuje jeho sekreci, ale již nedošlo k následné akumulaci ve tvaru CSD. Zřejmě jsou k tomu potřeba ještě další faktory, které zajistí jeho následnou lokalizaci do vznikající CSD. U signálu CASP1-GFP nebyla pozorována téměř žádná laterální difuze ve chvíli, kdy došlo k vytvoření CSD, což přispívá k představě, že se CASP1 podílí na tvorbě lešení, které CSD tvoří a reguluje tak pozici dalších proteinů nezbytných pro lokalizovanou impregnaci buněčné stěny nad CSD. CASP2-4 po fúzi s GFP při ektopické expresi ukázaly stejný trend jako CASP1. Byly sice viditelné v oblasti plasmatické membrány, ale nebyly nijak specificky lokalizovány. Naproti tomu CASP5-GFP při ektopické expresi navodil vznik domén endoplasmatického retikula. To značí, že zejména tento protein potřebuje pro správnou lokalizaci další faktory specifické pro endodermis. Dvojité *cas1/cas3* mutanti vykazovaly defekty v utváření Casparyho proužků, především rozptýlenou depozici autofluorescenčního materiálu (pravděpodobně ligninu) do buněčných stěn endodermálních buněk místo vzniku Casparyho proužku. Přesto jejich endodermální vrstva zůstala funkční apoplastickou bariérou, jelikož přes něj neprostoupila apoplastická sonda propidium jodid (PI). Mutanti pouze v jednom z genů žádné defekty nevykazovali, což naznačuje alespoň částečnou redundanci mezi *CASP* geny (Roppolo et al. 2011).

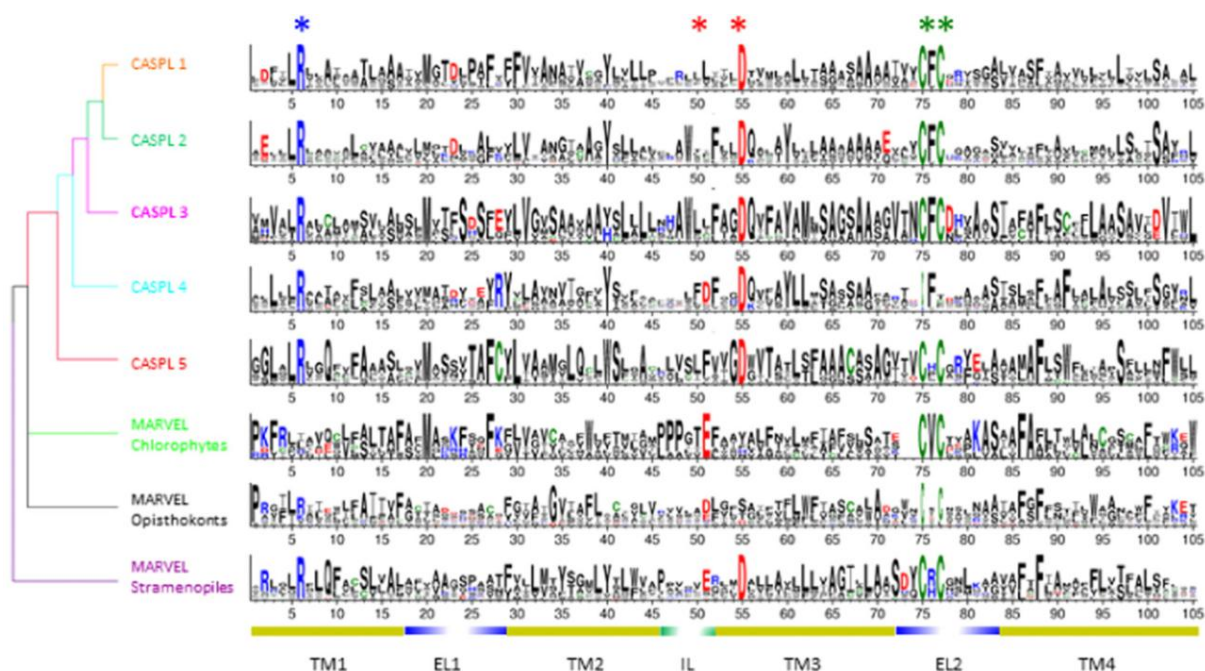


Obr. 8.6: Obrázek ukazuje předpokládaný vzhled CASP1. Převzato z (Roppolo et al. 2014).

8.4.5 Evoluce a zařazení CASP

Kromě rodiny CASP proteinů byla charakterizována rodina CASPL (CASP-like). Tyto homologní proteiny mají konzervovanou 1. a 3. transmembránovou doménu TM1 a TM3 a druhou extracelulární smyčku EL2. CASP proteiny se pak od CASPL odlišují přítomností velmi konzervované sekvence 9 aminokyselinových zbytků v první extracelulární smyčce EL1. S pomocí cílených mutací některých konzervovaných aminokyselin v těchto doménách u AtCASP1 bylo prokázáno, že TM3 je pravděpodobně nezbytná pro správné ustavení prostorové struktury proteinu. Dále bylo zjištěno, že extracelulární smyčky u proteinu CASP1 nemají přímý vliv na lokalizaci do CSD, pouze se na ní podílejí (Roppolo et al. 2014).

CASP a CASPL jsou svými konzervovanými transmembránovými doménami zřejmě příbuzné MARVEL-like doménám, které obsahují proteiny rodiny MARVEL. Na *Obr. 8.7* je zachycen předpokládaný vztah CASPL a MARVEL proteinů, kde jsou zvýrazněny homologní sekvence. MARVEL proteiny jsou popsány u živočichů a najdeme mezi nimi zástupce (např. okludiny), kteří se podílí na utváření těsných spojů (tight junction) mezi membránami sousedících buněk. Je tedy pravděpodobné, že MARVEL i CASPL proteiny mají podobnou funkci při vytváření membránových lešení nebo mikrodomén (Roppolo et al. 2014).



Obr. 8.7: Obrázek ukazuje vztah mezi proteiny CASPL a MARVEL. Jsou zvýrazněny homologní sekvence. Převzato z (Roppolo et al. 2014).

8.4.6 Role NADPH oxidázy RBOHF a peroxidázy PER64

NADPH oxidázy jsou důležitou složkou při vzniku Casparyho proužků (Lee et al. 2013). Při vzniku ligninu dochází k oxidaci monolignolů za vzniku radikálů, které spolu polymerizují (Boerjan et al. 2003). V endodermis je tato oxidace katalyzována peroxidázami (Lee et al. 2013). Ty potřebují pro tuto reakci peroxid vodíku (H_2O_2), jehož zdrojem jsou NADPH oxidázy. Bylo otestováno pomocí jejich inhibitoru, že H_2O_2 pro tuto reakci pochází z těchto oxidáz. NADPH oxidázy produkují superoxidový radikál, který je následně činností superoxidodismutázy přeměněn na peroxid vodíku. Zároveň bylo zjištěno, že mezi NADPH oxidázami, jejichž geny jsou v endodermis exprimovány, hraje klíčovou úlohu NADPH oxidáza RBOHF (Respiratory burst oxidase homolog F), která se nachází specificky v oblasti vznikajících Casparyho proužků (Lee et al. 2013). Vyřazení NADH oxidázy mělo za následek zastavení ukládání Casparyho proužků.

Pomocí DNA čipů byly nalezeny také endodermálně specifické peroxidázy, které jsou potřebné ke vzniku Casparyho proužků. Mezi nimi je klíčová peroxidáza PER64, která je výrazně a specificky exprimována v endodermis. Při jejím vyřazení došlo ke zpoždění v ukládání Casparyho proužků.

PER64 značená mCherry úplně kolokalizovala se signálem CASP1-GFP. Tato kolokalizace byla pozorována už ve stadiu „korálků na niti“, kdy CASP1 tvoří mikrodomény po celé

plasmatické membráně. To vypovídá o úzkém propojení CASP1 a PER64. To nebylo pozorováno u jiných peroxidáz, ačkoli se akumulovaly v oblasti CSD. U dvojitého mutantu *casp1/casp3* bylo pozorováno, že pro správnou lokalizaci PER64 jsou potřeba proteiny rodiny CASP. Bez nich k její správné lokalizaci nedošlo (Lee et al. 2013).

8.4.7 ESB1, protein s „řídící“ doménou

Protein Enhanced suberin 1 (ESB1) také hraje důležitou roli při vytváření Casparyho proužku (Hosmani et al. 2013). Celkově jsou proteiny s řídící doménou („dirigent domain“ proteiny) vnímány jako neenzymatický templát zprostředkovávající správné prostorové uspořádání vazby mezi dvěma monolignoly při tvorbě ligninu (Davin et al. 1997). *ESB1* je specificky exprimován v endodermis a lokalizován ve stejných místech jako Casparyho proužek. Pro svou správnou lokalizaci potřebuje přítomnost CASP proteinů. Umístění ESB1 značené mCherry odpovídalo umístění CASP1-GFP a lokalizace ESB1 do místa vznikajícího Casparyho proužku je narušena u dvojitého mutantu *casp1/casp3*. Mutant *esb1-1* prokázal, že bez ESB1 dojde k úplné ztrátě organizace při vzniku Casparyho proužku. Tento zdeformovaný proužek měl ale stále stejné složení jako proužek u divokého genotypu. U *esb1* mutantu překvapivě dochází také k poruše lokalizace CASP1 proteinu do vznikající membránové domény Casparyho proužku (CSD). CASP1-GFP signál byl pozorován pouze ve formě „korálek na niti“ a nikdy nedošlo k jeho následnému shluku, když nebyl přítomen ESB1. ESB1 poodhaluje i souvislost mezi ukládáním Casparyho proužků a biosyntézou suberinu. U *esb1* mutantu je funkce proužků oslabena a dochází ke zvýšené akumulaci suberinu v kořenech, především v oblasti endodermis (Baxter et al. 2009).

8.4.8 Polarita endodermis

CSD doména funguje také jako bariéra pro laterální pohyb membránových proteinů v plazmalemě endodermální buňky. Současně po jejím ustavení není již lipidový tracer FM4-64 schopen projít tímto konkrétním místem laterální difusí (Alassimone et al. 2010). Vznik CSD domény tedy rozděluje plazmalemu endodermis na dvě části – část sousedící s primární kůrou a část sousedící se středním válcem (Alassimone et al. 2010; Alassimone et al. 2012). Bylo zjištěno, že transportéry boru jsou spolehlivými markery pro určení této polarity endodermálních buněk (Alassimone et al. 2010; Takano et al. 2010). Transportér pro výdej borátového aniontu z buňky BOR1 se nachází ve vnitřní a kanál pro vstup kyseliny borité NIP5;1 ve vnější doméně plasmatické membrány (Takano et al. 2006; Takano et al. 2008; Takano et al. 2010). Samotná doména CSD ale není přímo potřebná pro ustavení této polarity, pouze

odděluje polární domény plasmatické membrány endodermální buňky (Alassimone et al. 2010; Alassimone et al. 2012).

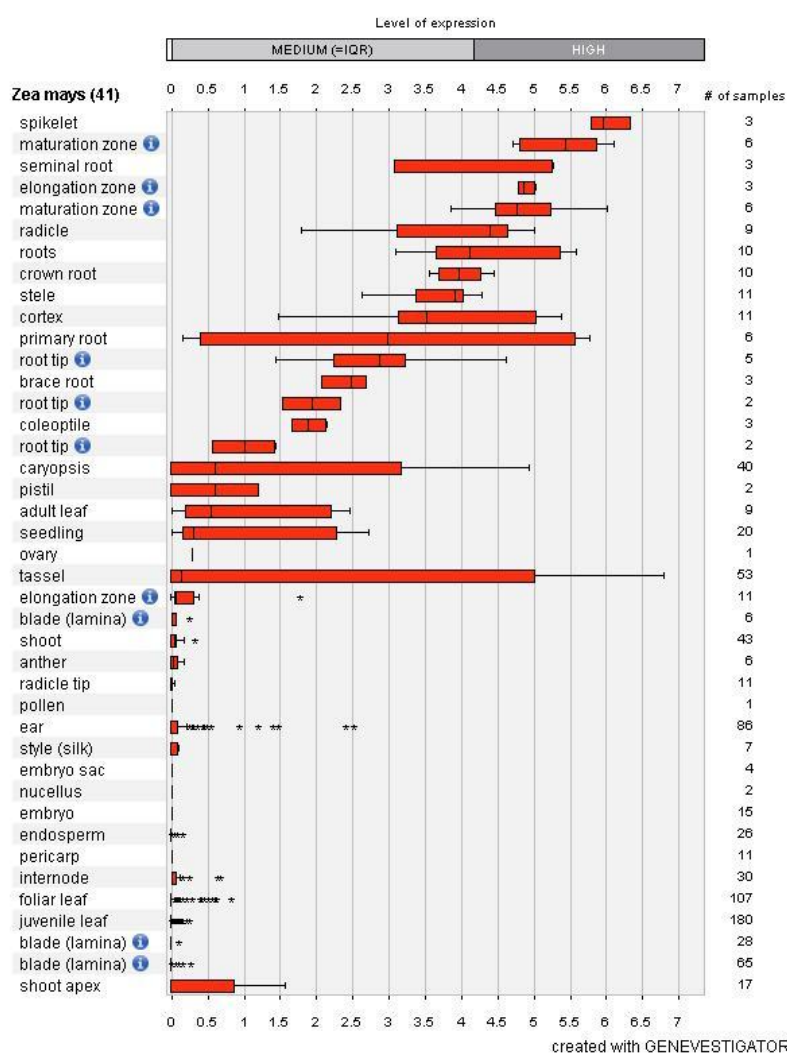
Polarizovaný výskyt membránových proteinů v endodermálních, příp. exodermálních buňkách umožňuje směřovaný tok látek kořenem (Alassimone et al. 2012; Barberon a Geldner 2014; Ma a Yamaji 2015). Kromě transportérů bóru byla také popsána polarizovaná lokalizace např. transportérů křemíku Lsi1 a Lsi2 (Low silicon rice 1, 2) v endodermis i exodermis (Ma et al. 2007; Mitani et al. 2009) nebo transportéru auxinu PIN3 v endodermis (Ding et al. 2011).

8.4.9 Ortology CASP genů u kukuřice - ZmCASP1 a ZmCASP2

Podle CASP proteinů nalezených u *Arabidopsis* byly hledány jejich ortology i u dalších rostlinných druhů. Vzhledem k zaměření diplomové práce na roli CASP proteinů ve vývoji exodermální vrstvy jsou zajímavé ortology CASP genů u rostlinných druhů tvořících exodermis ve svých kořenech. Pro kukuřici byly popsány dva ortology *ZmCASP1* a *ZmCASP2* (Roppolo et al. 2014): Oba geny *ZmCASP1* (GRMZM2G110832; LOC100282577; chrom. 9; B6T959 (CASP1_MAIZE) dle UniProtKB a *ZmCASP2* (GRMZM2G382104 (CASP-like protein 1) dle EnsemblPlant; LOC100285037; chrom. 2; B6U045 (CASP2_MAIZE) dle UniProtKB) jsou výrazně exprimované v kořenech. Na obrázcích znázorňujících expresi těchto genů (získaných pomocí programu Genevestigator) můžeme vidět, že je nevyšší právě v kořenech a výrazná především v elongační a maturační zóně (Obr. 8.8 a 8.9). Momentálně jsou CASP jedinými známými proteiny, které v rostlinách tvoří membránová lešení. Mají zásadní roli při řízení a směřování modifikací buněčné stěny. Pro jejich významnou roli byla zkoumána i rodina homologních proteinů – CASP-like proteiny. Pro kukuřici bylo CASP-like proteinů popsáno několik (Roppolo et al. 2014).

Dataset: 41 anatomical parts from data selection: ZM_mRNASeq_MAIZE_GL-4
1 transcript from gene selection: ZM-4

● GRMZM2G110832

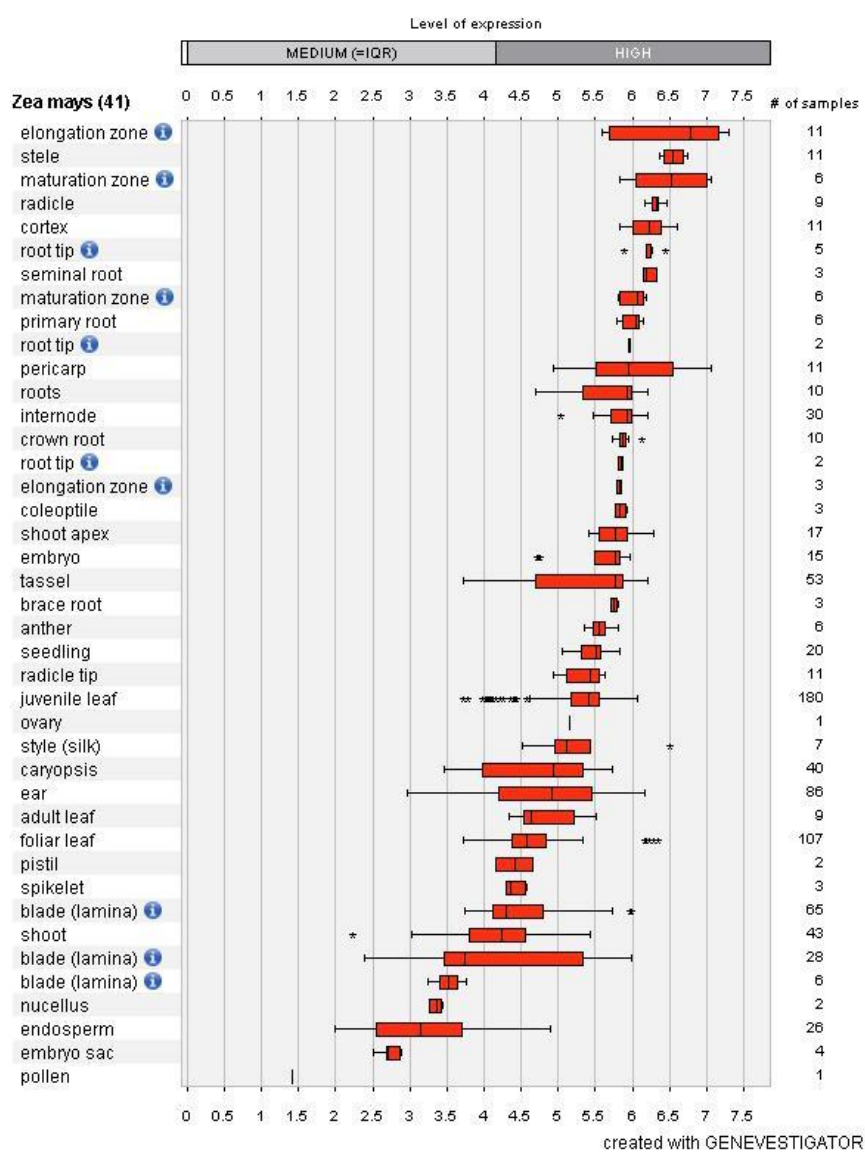


Obr. 8.8: Obrázek znázorňuje míru exprese genu *ZmCASPI* v jednotlivých částech rostliny. Lze vidět, že *ZmCASPI* je výrazně exprimován v maturační zóně. Obrázek byl vytvořen pomocí programu Genevestigator.

Dataset: 41 anatomical parts from data selection: ZM_mRNASeq_MAIZE_GL-3

1 transcript from gene selection: ZM-3

● GRMZM2G382104



Obr. 8.9: Obrázek znázorňuje míru exprese genu ZmCASP2 v jednotlivých částech rostliny. Lze vidět, že ZmCASP2 je výrazně exprimován v elongační a maturační zóně. Obrázek byl vytvořen pomocí programu Genevestigator.

9. Metodika

9.1 Pěstování rostlin

9.1.1 Experiment 1 – Analýza vlivu kadmia na postup diferenciacie apoplastických bariér v různých typech kořenů kukuřice

Semena kukuřice *Zea mays*, L. cv. Cefran (Oseva Bzenec, Česká republika) byly ponechány po dobu 4 dní klíčit na vlhkém filtračním papíře při pokojové teplotě. Pro kultivaci v hydroponii byly vybrány semenáčky s průměrnou délkou kořene asi 5 cm a bez postranních kořenů. Ty byly kultivovány v plastových nádobách o objemu 12l (Obr. 9.1). Rostliny byly v nádobách umístěny po 6 a hladina byla pokryta polyuretanovými kousky, aby nedocházelo k růstu řas a vystavení kořenů světlu. V kultivační místnosti byly nastaveny konstantní podmínky: 16/8 h denní/noční fotoperioda (ozáření 435 W.m^{-2}), 22/18 °C denní/noční termoperioda, relativní vlhkost vzduchu 50 - 75%. Ke kultivaci byl použit Hoaglandův roztok (Hoagland a Arnon 1950) zředěný na 1/4 s přidavkem mikroprvků (Laštůvka a Minář 1967) o následujícím složení (μM): NO_3^- 3750; PO_4^{3-} 254; Ca^{2+} 1249; K^+ 1501; Mg^{2+} 510; SO_4^{2-} 510; BO_3^{3-} 11,6; Fe^{2+} 5,1; Mn^{2+} 2,3; Zn^{2+} 0,34; Cu^{2+} 0,12; $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{2-}$ 0,015. V plastových nádobách byly rostliny pěstovány za různých podmínek (Tab. 1) po dobu 14 dní. Kultivační roztok byl v polovině trvání experimentu vyměněn. Kadmium bylo dodáno ze zásobního 5 mM roztoku CdCl_2 tak, aby roztoky pro pěstování byly 5 μM a 50 μM .



Obr. 9.1: Kultivace rostlin v experimentu 1

Varianta	Podmínky pěstování
AER	Provzdušňovaná hydroponie; saturace kyslíkem > 90%
AER+5Cd	Provzdušňovaná hydroponie + 5 μM Cd^{2+}
AER+50Cd	Provzdušňovaná hydroponie + 50 μM Cd^{2+}

Tab. 1 Podmínky kultivací v experimentu 1

9.1.2 Experiment 2 – Analýza kombinovaného vlivu kadmia a hypoxie na postup diferenciacce apoplastických bariér v kořenech cibule

Cibule (*Allium cepa* L.) byly pěstovány ve stejných kontrolních podmínkách jako kukuřice (viz. výše). Další varianta byla pěstována bez provzdušňování, třetí také bez provzdušňování a s přidavkem kadmia (Tab. 2). Rostliny byly takto pěstovány 14 dní. Poté byly odebrány jejich kořeny.

Varianta	Podmínky pěstování
AER	Provzdušňovaná hydroponie; saturace kyslíkem > 90%
STAG	Neprovzdušňovaná hydroponie s přidavkem 0,05% agar; saturace kyslíkem < 20%
STAG+5Cd	Neprovzdušňovaná hydroponie s přidavkem 0,05% agar; saturace kyslíkem < 20% + 5 μM Cd^{2+}

Tab. 2 Podmínky kultivací v experimentu 2

9.1.3 Experiment 3 – Analýza exprese genů ZmCASP u kukuřice

Kukuřice pro detekci exprese CASP genů byly pěstovány v průtokové hydroponii (Obr. 9.2). V horní nádobě byly pěstovány rostliny kukuřice. Z ní odtékala voda do nádoby spodní, odkud byla vyháněna motorkem přes UV lampu zpět do nádoby horní. Složení kultivačního roztoku bylo stejné jako v experimentu 1, rostliny měly celkem k dispozici 70 l roztoku. Rostliny byly kultivovány v kultivační místnosti se stejnými podmínkami jako v experimentu 1. Kultivace byla dlouhodobá, zhruba po 3 týdnech byly postupně odebírány nodální kořeny dlouhé cca 10 cm.



Obr. 9.2: Dlouhodobá kultivace rostlin v experimentu 3.

9.2 Vyhodnocení vlivu kadmia na postup diferenciacce apoplastických bariér u kukuřice (experiment 1)

9.2.1 Morfologická analýza kořenů

Analýza byla prováděna na primárních (seminálních) kořenech kukuřice. Z každé varianty byly pro účel analýzy odebrány primární kořeny 3 rostlin. Kořeny staré 18 dní byly naskenovány a byla změřena délka jejich hlavního kořene a délka i počet postranních kořenů prvního a vyšších řádů pomocí programů Smart Root a NIS elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging; <http://www.nis-elements.cz/en>).

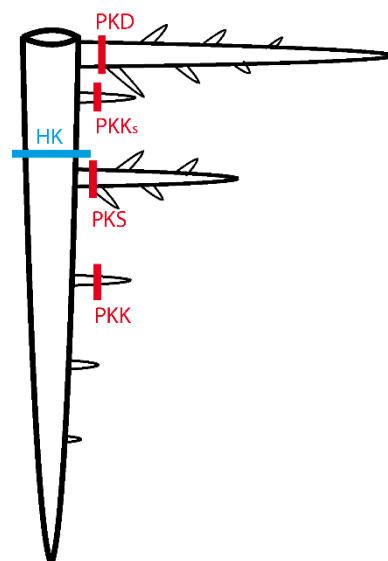
9.2.2 Anatomická analýza kořenů

Anatomická analýza byla provedena v několika různých pozicích z důvodu zachycení variability mezi hlavním a postranními kořeny. Analyzovány byly pozice na hlavní ose primárního kořene i jeho postranních kořenech různé délky (viz. *Tab. 3* a *Obr. 9.3*).

HK	hlavní kořen
PKD	dlouhé postranní kořeny nacházející se u báze hlavního kořene
PKS	středně dlouhé postranní kořeny nacházející se ve $\frac{3}{4}$ délky hlavního kořene
PKK	krátké nevětvené postranní kořeny nacházející se v $\frac{1}{2}$ délky hlavního kořene
PKK _s	postranní kořeny stejné délky jako PK-K, ovšem u báze hlavního kořene

Tab. 3. Pozice analyzované v rámci hlavního osy primárního kořene a jeho postranních kořenů 1. řádu

Kořeny byly fixovány v 4 % formaldehydu s fosfátovým pufrem. Ze všech kořenů byly odebrány asi 0,5 cm velké úseky nacházející se u báze kořenů z důvodu vyhodnocení stupně vývoje apoplastických bariér v těchto kořenech. U kořenů hlavních (HK) byl odebrán úsek ze $\frac{3}{4}$ délky kořene od špičky, u postranních (PK) úsek ve vzdálenosti 1 cm od báze. Jednotlivé úseky byly nařezány na ručním mikrotomu. Pro detekci suberinu byly řezy barveny barvou Sudan Red 7B (0,01 %) (Brundrett a Kendrick 1991) 1 hodinu, pro detekci ligninu berberin hemisulfátem (0,1 % aq.) 1 hodinu (Brundrett et al. 1988) a poté ještě 10 minut genciánovou violetí (0,05 % aq.), kvůli potlačení autofluorescence. Vzorky byly uzavřeny do 65 % glycerolu a pozorovány mikroskopem Olympus BX51 vybaveným filtrem UV Olympus U-MWU a digitální kamerou Apogee U4000. U řezů jsem se zaměřila na pozorování spojitosti exodermální a endodermální vrstvy v kořenech, tedy konkrétně na výskyt buněk s přítomnými Casparyho proužky (CP) nebo suberinovými lamelami (SL). Kořeny byly rozděleny do 5 kategorií podle toho, v kolika buňkách endodermální či exodermální vrstvy byly uloženy CP (Tab. 4). Stejně kategorie byly zavedeny i pro výskyt SL v endodermální i exodermální vrstvě.



Obr. 9.3: Schematické znázornění pozic analyzovaných v rámci primárního kořene kukuřice.

Kategorie	
0	v žádných buňkách nebyly CP detekovány
I	< 20% buněk s vyvinutými CP
II	50% buněk s vyvinutými CP
III	> 90% buněk s vyvinutými CP
IV	celá buněčná vrstva obsahovala vyvinuté CP

Tab. 4. Kategorie použité pro hodnocení výskytu Casparyho proužků (CP) a suberinových lamel (SL) v endodermis a exodermis analyzovaných kořenů.

Kromě výskytu diferencovaných Casparyho proužků byla analyzována také jejich délka. Délky endo a exodermálních CP byly měřeny u vzorků obarvených berberinem pomocí programu NIS Elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging) a následně vztaženy k délce radiální stěny endodermálních nebo exodermálních buněk.

9.2.3 Elektronová mikroskopie

Pro účely transmisní elektronové mikroskopie byly kořenové segmenty fixovány v 2,5% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru (0,1 M; pH 7,2), poté fixovány v 2 % oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru, dehydratovány pomocí etanolové řady a uzavřeny do pryskyřice (LR White). Ultratenké řezy byly pozorovány pomocí mikroskopu JEOL JEM-1011 s kamerou Veleta CCD a softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH.

9.2.4 Testy permeability

Pomocí apoplastické sondy (traceru), kyseliny jodisté (H_5IO_6), byla zkoumána propustnost povrchových vrstev kořenů rostlin kukuřice, které rostly v kontrolních podmínkách s rostlinami rostoucími za přítomnosti 5 a 50 μM Cd. Rostliny byly pěstovány identickým způsobem jako rostliny pro anatomickou analýzu (experiment 1). Kořeny intaktních rostlin byly následně ponořeny do 0,1 % vodného roztoku H_5IO_6 na 30 minut, poté byly krátce opláchnuty vodou a přeneseny na 30 min do redukčního roztoku (Soukup et al. 2007). Redukční roztok se připraví rozpuštěním 1g KI + 1g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml destilované vody a přidáním 0,5 ml 2M HCl (Pearse 1985; Soukup et al. 2014).

Inkubované kořeny byly řezány na ručním mikrotomu. Zkoumány byly řezy ze stejných oblastí, v jakých byla prováděna anatomická analýza (*Tab. 3, Obr. 9.3*). Jak daleko kyselina jodistá v řezu prostoupila, bylo na řezech detekováno pomocí Schiffova roztoku. Schiffův roztok se připraví rozpuštěním 1 g bazického fuchsinu ve 200 ml vařící destilované vody. Roztok se nechá zchladnout na 50°C a přefiltruje se přes filtrační papír. Přidá se 20 ml 1 M HCl a roztok se nechá zchladnout na 25°C. Poté v roztoku rozpustíme 1 g Na₂S₂O₅. Roztok se nechá ve tmě 14 – 24 h, přidají se asi 2 g aktivního uhlí a přefiltrováním vznikne bezbarvý roztok. Řezy byly inkubovány v Schiffově roztoku 20 min a poté opláchnuty v SO₂ vodě a uzavřeny do 50 % glycerolu s SO₂ vodou (směs 1 : 1). Příprava SO₂ vody začíná smícháním 5 ml 1M HCl s 5 ml 10 % K₂S₂O₅ a poté se před použitím přidá 100 ml vody (Pearse 1985; Soukup et al. 2014). Obarvené řezy byly snímány stejně jako v případě anatomické analýzy a propustnost povrchových vrstev kořenů byla vyhodnocována jako vzdálenost průniku kyseliny jodisté do kořene ve srovnání s šířkou primární kůry a rhizodermis, vzdálenosti byly měřeny s pomocí programu NIS Elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging).

9.3 Vyhodnocení kombinovaného vlivu kadmia a hypoxie na postup diferenciaci apoplastických bariér u cibule (Experiment 2)

Tento experiment byl koncipován jako doplňkový k experimentu č. 1. Jeho úkolem bylo ověření vlivu Cd v kombinaci s hypoxií na jiném rostlinném druhu. Hlavní kořeny cibule byly nařezány v 3/4 délky a obarveny berberinem a genciánovou violetí pro detekci ligninu, a sudanem pro detekci suberinu.

9.4 Analýza exprese genů *ZmCASP* v kořenech kukuřice (Experiment 3)

9.4.1 Odběr materiálu

Pro analýzu CASP genů byly odebírány nodální kořeny kukuřice z dlouhodobé kultivace (*Obr. 9.4*). Odebírány byly nodální kořeny vyvíjející se po celou dobu ponořené pod hladinou kultivačního roztoku. Odebrané nodální kořeny byly směrem od špičky rozděleny na 1 cm dlouhé úseky. Tyto centimetrové úseky byly střídavě rozděleny. Segmenty 0-1, 3-4, 5-6, 7-8 a 9-10 cm od špičky byly umístěn do fixáže (4% formaldehyd) a posléze použity pro anatomickou analýzu. Segmenty 1-2, 4-5, 6-7 a 8-9 cm byly



Obr. 9.4: Nodální kořeny kukuřice.

urychleně pod binokulární lupou pomocí hodinářských pinzet co nejpřesněji rozděleny v oblasti střední části primární kůry na dva díly. Tím došlo k oddělení endodermální a exodermální vrstvy pro následnou analýzu exprese *ZmCASP* genů odděleně v endodermis a exodermis. Přesnost odtržení byla nejprve kontrolována na ručních řezech. Po rozdělení byly vzorky spolu s homogenizačními kuličkami neprodleně umístěny do tekutého dusíku a následně skladovány při teplotě - 80°C. Poté byly použity pro detekci exprese *ZmCASP* genů.

9.4.2 Anatomická analýza nodálních kořenů

Odebrané fixované segmenty kořenů byly řezány na ručním mikrotomu a obarveny berberinem (0,1 % aq.) 1 hodinu a poté 10 minut genciánovou violetí (0,05 % aq.) pro detekci výskytu lignifikovaných Casparyho proužků. Řezy byly uzavřeny v 65 % glycerolu a pozorovány pomocí mikroskopu Olympus BX51 s filtrem UV Olympus U-MWU a digitální kamerou Apogee U4000.

9.4.3 Navržení primerů pro *CASP* geny

Ověření zapojení *CASP* genů v diferenciaci exodermální vrstvy bylo podloženo sekvencemi kukuřičných *CASP* genů – *ZmCASP1* a *ZmCASP2* (Roppolo et al. 2014). Sekvence genů byly získány v databázi ENA (www.ebi.ac.uk/ena) – pro *ZmCASP1* (B6T959) byla použita sekvence mRNA >ENA|EU961524|EU961524.1 a pro *ZmCASP2* (B6U045) sekvence >ENA|EU970610|EU970610.1. Návrh primerů pro tyto geny byl proveden pomocí Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Vybrané primery nefungovaly hned napoprvé, v tabulce jsou uvedeny ty funkční (Tab. 5).

Primer	Sekvence
<i>ZmCASP1</i> _forward primer	GGGTGTCAGCAAAGGAGTGT
<i>ZmCASP1</i> _reverse primer	AGATACGCTCGCAGAACGAG
<i>ZmCASP2</i> _forward primer	CCGCCTTCACCATCAGGAAA
<i>ZmCASP2</i> _reverse primer	ACATGAAACCAGGCCGAGAA

Tab. 5. Primery použité pro detekci exprese *ZmCASP1* a *ZmCASP2*

Dále byly vybrány primery pro pozitivní kontrolu při semikvantitativní PCR. Podle článku (Lin et al. 2014) byly jako referenční geny vybrány geny pro elongační faktor 1 alfa (*EF1a*) a beta tubulin (*β-TUB*), jelikož byly ve článku zařazeny mezi nejspolehlivější referenční geny pro sledování genové exprese u kukuřice. Sekvence jejich primerů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6). Primery byly vyrobeny firmou Generi Biotech nebo Sigma-Aldrich.

Primer	Sekvence
<i>EF1a</i> _forward primer	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA
<i>EF1a</i> _reverse primer	ACATACCCACGCTTCAGATCCT
β - <i>TUB</i> _forward primer	CTACCTCACGGCATCTGCTATGT
β - <i>TUB</i> _reverse primer	GTCACACACACTCGACTTCACG

Tab. 6. Primery použité pro detekci exprese referenčních genů

9.4.4 Izolace genomové DNA z kořenů kukuřice

Pro ověření funkčnosti primerů, které byly navrženy pro detekci exprese *ZmCASP* genů, byla nejprve izolována genomová DNA. Pro izolaci rostlinné DNA k dalším účelům byla použita metoda izolace pomocí Plant DNAzol® Reagentu od firmy Thermo Fischer Scientific.

Do zkumavky o objemu 2 ml se dvěma homogenizačními kuličkami bylo přidáno cca 100mg čerstvé rostlinné hmoty špiček nodálních kořenů *Zea mays*, L. cv. Cefran. Pro takové množství rostlinného materiálu bylo třeba 6 – 7 nodálních kořenů o délce 10 cm, z nichž byly odebrány centimetrové segmenty od kořenové špičky směrem vzhůru. Zkumavka byla neprodleně vložena do tekutého dusíku. Zmrzlá hmota byla homogenizována ve vibračním mlýnu Retsch MM301 při 25 kmitech/s po dobu 30s. K rozdrcené hmotě bylo přidáno 0,3 ml DNAzolu na 100 mg, vyňaty nerezové homogenizační koule a tato směs se nechala 5 minut třepat. Poté bylo přidáno 0,3 ml chloroformu a obsah zkumavky se nechal opět 5 minut třepat. Vzorek byl následně centrifugován 10 minut při 12 000 rpm. Horní fáze byla odpipetována do čisté zkumavky. K ní bylo přidáno 0,225 ml 96% etanolu a obsah byl ručně promíchán. Poté se nechala zkumavka odstředit 4 minuty při 5000rpm a etanol se odsál. Přidalo se 0,3 ml promývacího pufru DNAzol (poměr DNAzol : 96% p.a. etanol → 1 : 0,75), obsah byl protřepán a pufr se nechal 5 minut působit. Následovalo opět odstředění po dobu 4 minut při 5000rpm, promývací pufr byl odstraněn překlopením zkumavky na filtrační papír. Přidalo se 0,3 ml 75% etanolu, zkumavka se protřepala a byla odstředěna 4 minuty při 5000 rpm. Etanol se odsál překlopením na filtrační papír. Peleta DNA ve zkumavce se nakonec nechala rozpustit v 40 μ l TE pufru.

9.4.5 Izolace mRNA

Izolace mRNA probíhala z vybraných segmentů odebraných podél osy kořene (viz. výše). Přibližně 100 mg zmrazené rostlinné hmoty se dvěma homogenizačními kuličkami v mikrozkušavce (2 ml) bylo homogenizováno ve vibračním mlýnu Retsch MM301 při 25 kmitech/s po dobu 30s. Rostlinný materiál nesmí rozmraznout, proto byla práce prováděna na

ledu. Izolace mRNA byla prováděna pomocí kitu RNeasy® Plant Mini Kit od společnosti Qiagen®. Před zahájením samotné izolace byl do RLT pufru přidán β -merkaptoetanol v poměru 10 μ l β -merkaptoetanolu na 1 ml RLT pufru. 450 μ l tohoto roztoku bylo přidáno ke zmrazeným vzorkům, homogenizační kuličky byly odebrány a roztok se vzorky protřepán (na třepačce Vortex). Poté byl roztok inkubován v lázni při 56°C po dobu 1-3 min. Zhruba 500 μ l lyzátu bylo přeneseno do fialové kolonky a centrifugováno 2 minuty maximální rychlostí. Za stálého objemu pipety byl roztok odpipetován do čisté mikrozkušavky, aby nedošlo ke zvržení vzniklého peletu. K lyzátu byl přidán zhruba poloviční objem 96% etanolu a obsah zkumavky byl neprodleně promíchán opakovaným nasátím do pipety. Vzorek byl přenesen do růžové kolonky a centrifugován 15 s při 10 000 kmitech/min. Proteklý roztok byl vylit, na sítko bylo pipetováno 350 μ l RW1 a kolonka opět centrifugována (15 s při 10 000 kmitech/min). Izolace mRNA zahrnovala i krok digesce DNA. Nejprve bylo třeba smíchat 10 μ l DNasy s 70 μ l RDD pufru. Mikrozkušavka se protřepala v ruce a pak na chvíli centrifugovala, aby zbylý roztok stekl ze stěn dolů. Tento roztok byl pipetován na membránu kolonky a inkubován 15 min při 20 – 30°C.

Poté byl na membránu kolonky přidán znovu RW1 pufr (350 μ l) a kolonka centrifugována při 10 000 kmitech/min. Roztok, který protekl, byl vylit. Dále bylo na membránu pipetováno 500 μ l RPE pufru a následně byla kolonka opět centrifugována 15 s při 10 000 kmitech/min. Roztok, který protekl, byl vylit. Znovu bylo na membránu pipetováno 500 μ l RPE pufru a kolonka centrifugována 2 min při 10 000 kmitech/min. Roztok, který protekl, byl vylit. Poté byla kolonka znovu centrifugována 1 min při 10 000 kmitech/min. Následně byla kolonka umístěna do 1,5 ml sterilní mikrozkušavky. Na membránu kolonky bylo přidáno 30-50 μ l RNase – free vody. Chvíli se počkalo a následovala centrifugace při 10 000 kmitech/min po dobu 1 min. Do mikrozkušavky byl vymyt produkt – mRNA.

Po izolaci následovalo změření obsahu RNA v roztoku spektrofotometricky přístrojem NanoDrop (Thermo Scientific). Z izolovaného roztoku RNA bylo 0,5 μ l doplněno 5 μ l (v poměru 1:10). Nejdříve byly na přístroj nanесeny 2 μ l destilované vody kvůli kalibraci. Až potom byly nanесeny 2 μ l roztoku s RNA a provedeno měření.

9.4.6 RT-PCR

Izolovaná mRNA zbavená kontaminace DNA posloužila jako templát pro syntézu cDNA pomocí reversní transkripce. Pro tento krok byl použit TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Thermo Fischer Scientific). Do reakce se pipetují nejprve RNA a oligo (dT)₁₆ primery,

kteře jsou denaturovány při 65°C. Následně je přidán premix. Celkové složení směsi udává *Tab. 7*, časové schéma reakce pak *Tab. 8*.

Složení	20 µl reakce
Oligo d(T)16 (50 µl)	1 µl
RNA templát	10 µl
Premix	20 µl reakce
RT pufr 10x	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,4 µl
dNTP mix (10 mM)	4 µl
Inhibitor RNAs	0,5 µl
MultiScribe RT	0,5 µl
Sigma H ₂ O	0,6 µl

Tab. 7. Složení směsi pro RT-PCR

Teplota (°C)	Čas (min)
RNA + primery	
65°C	5:00
4°C	2:00
RNA + primery + premix	
37°C	45:00
95°C	5:00
4°C	∞


Tab. 8. Časové a teplotní schéma RT-PCR

9.4.7 Polymerázová řetězová reakce

Tato reakce byla používána pro detekci cílové sekvence *ZmCASP* genů v cDNA nebo genomové DNA. K reakci byla používána termostabilní Taq DNA dependentní polymeráza. Teplota nasedání primerů, která je odvozena od jejich teploty tání (*T_m*), byla použita podle *T_m* kalkulátoru, který se nachází na stránkách výrobce polymerázy, firmy Thermo Scientific. Tato teplota se zpravidla liší od *T_m* asi o 3 – 6°C. Reakce byly míchány vždy na ledu, v objemu 20 µl. Vždy byly používány 0,2 ml PCR zkumavky. Celkové složení směsi udává *Tab. 9*, časové schéma reakce pak *Tab. 10*. Použité primery jsou uvedeny v *Tab. 5 a 6*.

Premix	20 µl reakce
DNA	1 µl
Taq polymeráza (5 U/µl)	0,04 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Přímý primer (forward) (20 µl)	0,5 µl
Zpětný primer (reverse) (20 µl)	0,5 µl
Pufr 10x Taq	2 µl
dH ₂ O	15,46 µl

Tab. 9. Složení směsi pro PCR

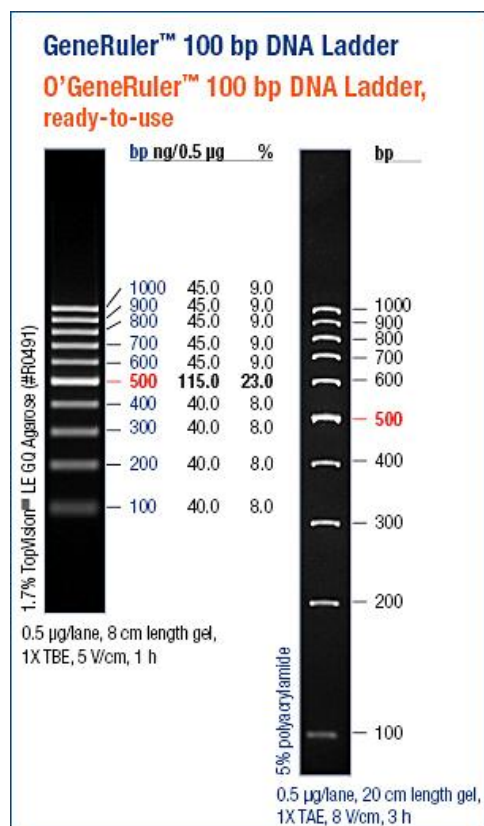
Fáze cyklu	Teplota (°C)	Čas (min)	 35 x
Počáteční denaturace	94°C	2:00	
Denaturace	94°C	0:30	
Nasedání primerů	dle T _m calculatoru	0:30	
Syntetická fáze	72°C	1:00	
Terminální syntetická fáze	72°C	10:00	
Zchlazení	10°C	∞	

Tab. 10. Časové a teplotní schéma PCR

9.4.8 Agarózová gelová elektroforéza

Tato metoda umožňuje oddělit makromolekuly na základě jejich velikosti a náboje. Makromolekuly se gelem pohybují pomocí stejnosměrného elektrického proudu.

Příprava agarózového gelu probíhala rozvařením ingrediencí (Tab. 11) v mikrovlnné troubě a následným nalitím rozvařeného média do formy s hřebeny, díky nimž se v gelu vytvořily jamky. Po ztuhnutí byl gel ponořen do elektroforézni vany s 0,5x TAE pufrem. Ten byl připraven z roztoku 50x TAE purfu, jehož složení je uvedeno v Tab. 12. Poté byly do jamek v gelu vneseny vzorky smíchané s roztokem BPB (Tab. 13) v poměru 5:1. Vedle nich byl pro určení délky DNA fragmentů v gelu nanášen marker 100bp Gene Ruler od firmy Thermo Scientific (Obr. 9.5). K vizualizaci gelů byl použit G:BOX s UV transiluminátorem a program GeneSnap (SynGene).



Obr. 9.5. Použitý marker délek fragmentů DNA na gelu.

Složky	Koncentrace v roztoku	Množství
agaróza	1,2 %	3,6 g
0,5x TAE	-	300 ml
GelRed™	0,01 %	30 µl

Tab. 11. Složky gelu pro agarózovou gelovou elektroforézu

Složky	Množství
TRIS base	121 g
kyselina octová (vychlazená)	2,5 ml
EDTA	50 ml
dH ₂ O	421,5 ml

Tab. 12. Složení 50x TAE pufru

Složka	Koncentrace v roztoku	Objem
bromfenolová modř	0,03 %	0,015 g
glycerol (99,2 %)	60 %	30,24 ml
TRIS HCl (100 mM; pH 7,6)	10 mM	5 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	60 mM	6 ml
dH ₂ O	doplnění do 50 ml	8,76 ml

Tab. 13. Složení roztoku BPB

9.4.9 Izolace DNA fragmentů z gelu

Pro použití při sekvenaci byla DNA extrahována z agarózového gelu. Jednotlivé proužky byly z gelu vyříznuty pod UV lampou. Poté byla provedena purifikace DNA pomocí High Pure PCR Product Purification Kitu od firmy Roche. Do mikrozkušavky s vyříznutou částí gelu bylo přidáno 300 µl Binding pufru na 100 mg gelu. To bylo vortexováno do téměř úplného rozpuštění gelu. Pak byl roztok inkubován 10 min při 56°C a 600 kmitech/min. Po úplném rozpuštění gelu bylo přidáno 150 µl izopropanolu na 100 mg gelu a důkladně vortexováno. Do kolonky byl vložen filtr a všechn získaný roztok byl na něj přenesen. Pak následovalo odstředění při 15 000 kmitech/min po dobu 1 min. Tekutina, která protekla, byla vylita. Filtr byl vrácen do stejné kolonky a na něj bylo přidáno 500 µl promývacího pufru s přidáním etanolem. To bylo odstředěno 1 min při 15 000 kmitech/min. Tekutina, která protekla, byla vylita. Filtr byl vrácen do stejné kolonky a bylo přidáno 200 µl promývacího pufru. Následovala centrifugace 1 minutu při 15 000 kmitech/min. Roztok, který protekl, i kolonka, byly vyhozeny. Filtr s navázanou DNA byl vložen do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Na filtr bylo přidáno 100 µl eluačního pufru a mikrozkušavka se nechala chvíli stát. Poté byla 1 min centrifugována při 15 000 kmitech/min. V tuto chvíli mikrozkušavka obsahovala purifikovanou DNA.

9.4.10 Sekvenace

Sekvenací byly ověřovány cílové sekvence *ZmCASP1* a *ZmCASP2* detekované v cDNA. Sekvenace byly zpracovány v laboratoři sekvenace DNA PřF UK. Vzorky pro sekvenaci byly připraveny podle pokynů laboratoře. Získané sekvence byly porovnány s cílovými sekvencemi *ZmCASP* genů v programu Geneious R6.1.7 (2005-2013 Biomatters Ltd.).

9.4.11 Statistické zpracování dat

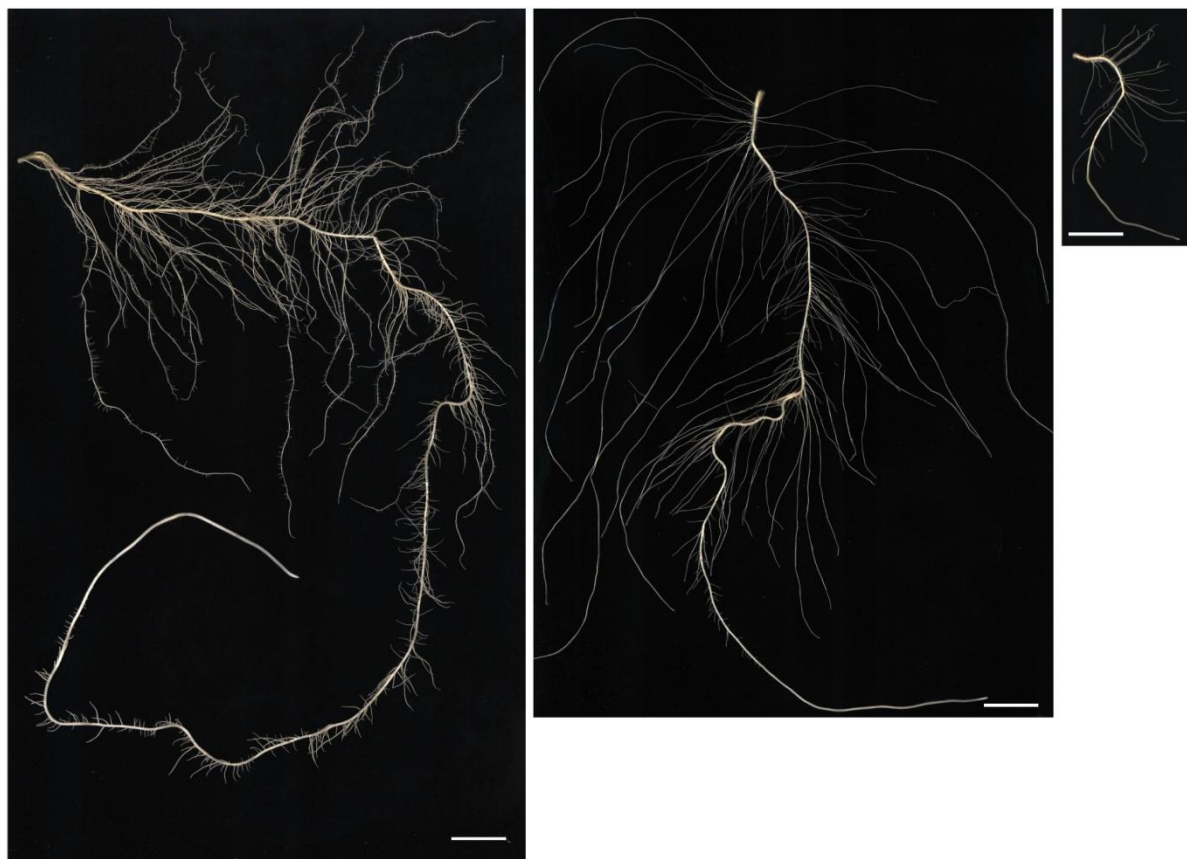
Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu NCSS 9 verze 9.0.15 (Hintze, J. 2013 NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; www.ncss.com). Vliv varianty kultivace na morfologie kořene byl analyzován pomocí analýzy variance jednoduchého třídění (One-Way ANOVA). Vliv varianty kultivace a typu kořene na diferenciaci apoplastických bariér byl analyzován s pomocí analýzy variance (GLM ANOVA, Bonferroni test).

10. Výsledky

10.1 Vliv kadmia na diferenciaci bariér v kořeni kukuřice (Experiment 1)

10.1.1 Morfologie primárního kořene

Celkový vzhled primárních kořenů kukuřice *Zea mays* byl podroben detailní morfologické analýze. Kořeny ze všech variant kultivace (hydroponie bez přídavku kadmia – kontrolní varianta, hydroponie + 5 μM Cd a hydroponie + 50 μM Cd) byly porovnány mezi sebou (Obr. 10.1). Pouhým okem bylo patrné, že kořeny vystavené vlivu 50 μM Cd byly pokroucené. Hlavní osa kořene byla u rostlin rostoucích v 50 μM Cd výrazně kratší ve srovnání s kořeny kontrolními a kořeny z 5 μM Cd (graf 1; ANOVA, $p < 0,001$). Také celková délka postranních kořenů byla větší u kontrolních rostlin a s rostoucím množstvím kadmia se postranní kořeny celkově zkracovaly (graf 2; ANOVA, $p < 0,05$) a klesal i jejich počet (graf 3; ANOVA,

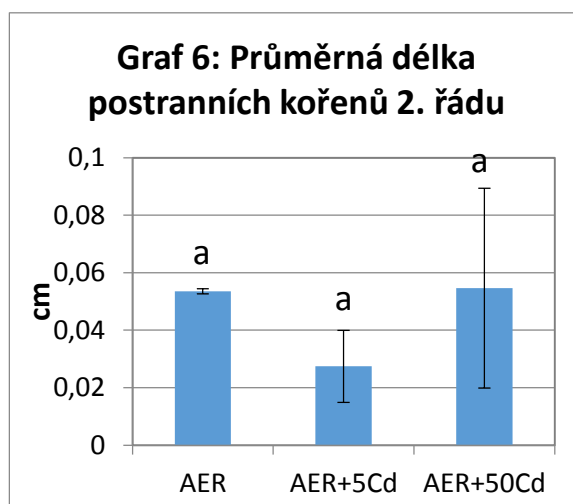
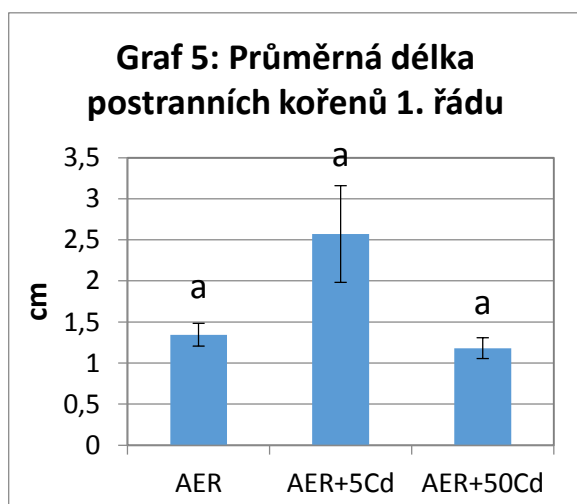
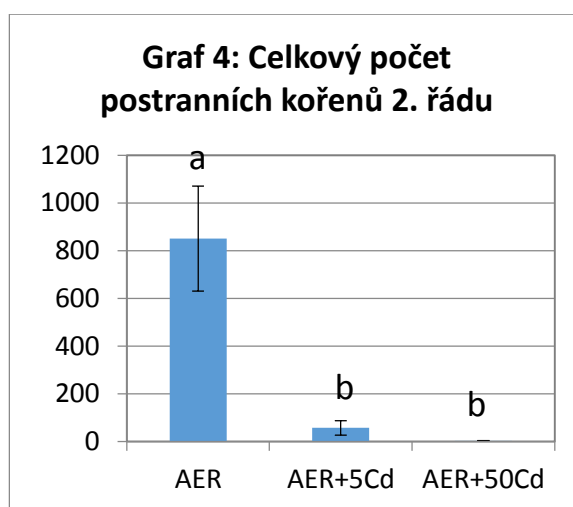
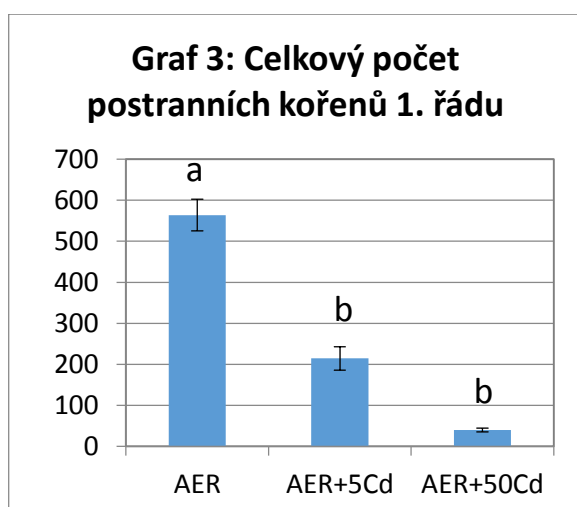
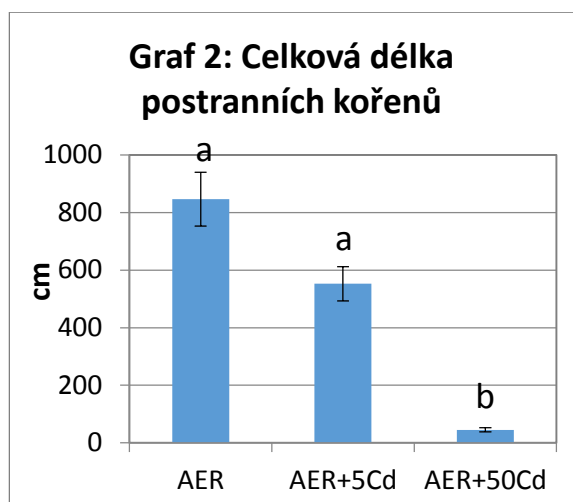
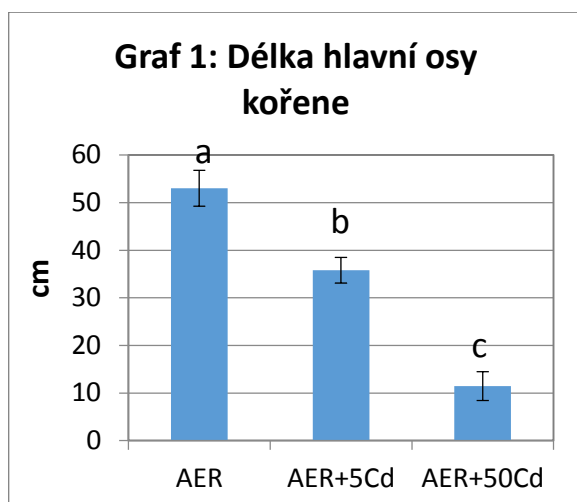


Obr. 10.1: Naskenované kořeny kukuřice (*Zea mays*) z kontrolních podmínek (vlevo), 5 μM Cd (uprostřed) a 50 μM Cd (vpravo). Měřítka vždy odpovídá 2 cm.

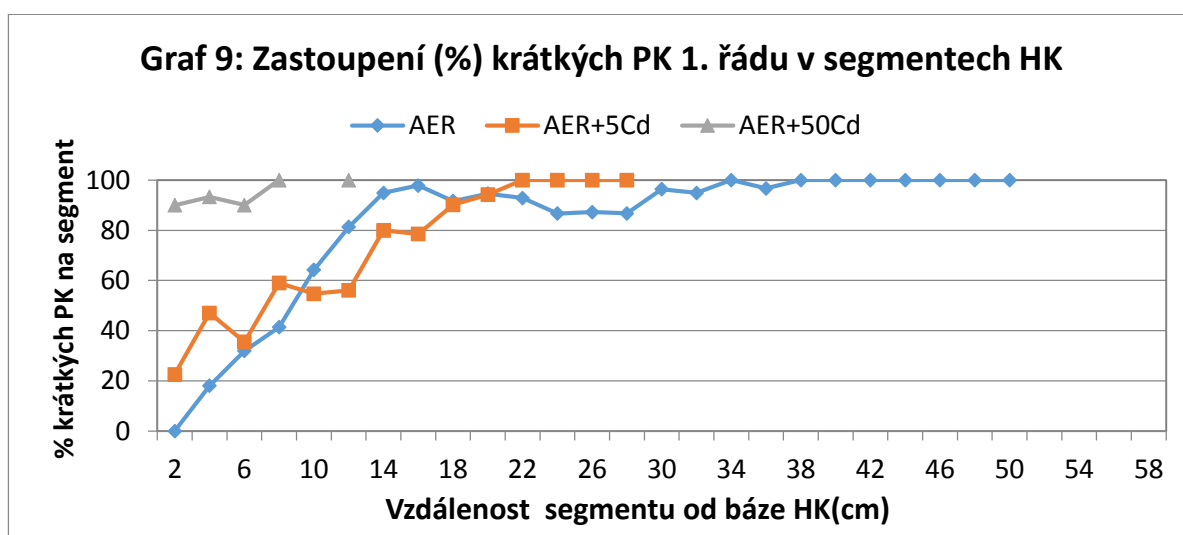
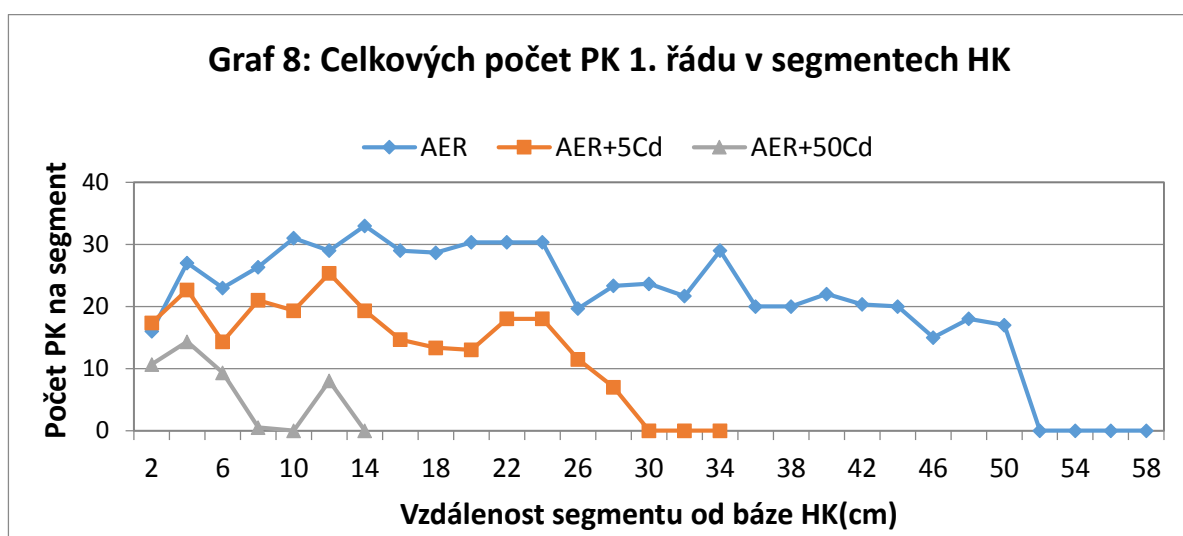
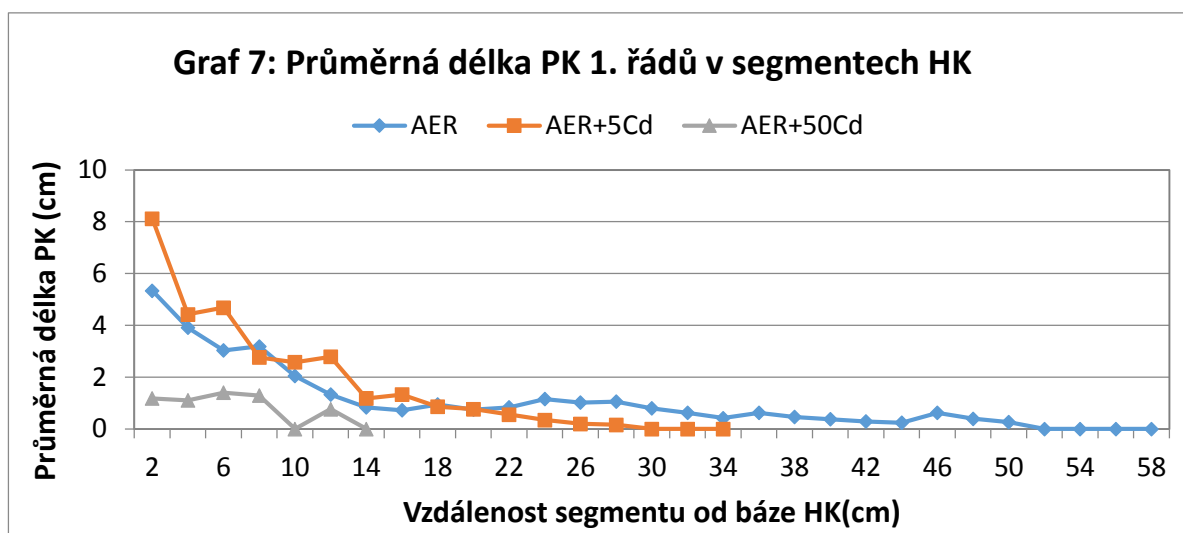
Bonferroni test, $p < 0,05$; *graf 4*; ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$). Detailnější analýza větvení primárního kořene

ukázala, že pod vlivem kadmia klesal celkový počet postranních kořenů 1. řádu (*graf 3*; ANOVA, $p < 0,05$) i 2. řádu (*graf 4*; ANOVA, $p < 0,05$). Průměrná délka postranních kořenů však nebyla takto výrazně ovlivněna ani u postranních kořenů 1. řádu (*graf 5*; ANOVA, $p = 0,08$) ani 2. řádu (*graf 6*; ANOVA, $p > 0,05$). Srovnáváno bylo dále rozložení růstu mezi hlavní osu kořene a kořeny postranní. To bylo vypočítáno jako poměr délky hlavní osy kořene a celkové délky všech kořenů postranních. Tento poměr byl nižší u kontrolních rostlin (0,07) a rostlin z 5 μM Cd (0,06), naproti tomu u rostlin z 50 μM Cd byl tento poměr signifikantně vyšší (0,33; ANOVA, $p < 0,05$, $n = 3$). Měnila se také délka nevětvené části hlavní osy kořene. Ve variantě s 50 μM Cd byla průkazně kratší (1,6 cm) oproti kontrolní variantě (8,2 cm) a variantě s 5 μM Cd (6,6 m; ANOVA, $p < 0,05$, $n = 3$).

U postranních kořenů prvního řádu bylo dále sledováno jejich rozmístění a růst podél osy hlavního kořene. Postranní kořeny 1. řádu byly analyzovány (počet, délka) vždy na úseku hlavní osy dlouhém 2 cm (postupně od báze směrem ke špičce kořene). Kontrolní kořeny vykazovaly rozmístění postranních kořenů prvního řádu vcelku rovnoměrné. Jejich celkový počet byl v jednotlivých segmentech hlavní osy směrem od báze ke špičce kořene víceméně stejný (*graf 7*), postupně ke špičce se snižovala jejich průměrná délka (*graf 8*) a zvyšovalo se zastoupení krátkých (kratších než 2 cm) postranních kořenů 1. řádu (*graf 9*). Ve variantě s 5 μM Cd byl tento trend víceméně zachován, ale průměrná délka postranních kořenů 1. řádu byla vyšší v blízkosti báze hlavní osy kořene, poté však rychleji klesala (*grafy 7, 8, 9*). Naopak přidavek 50 μM Cd způsobil nerovnoměrný růst postranních kořenů podél hlavní osy, průměrná délka postranních kořenů 1. řádu i zastoupení krátkých postranních kořenů se měnilo nerovnoměrně, což naznačuje narušení akropetální sekvence růstu postranních kořenů v této variantě (*grafy 7, 8, 9*).



Grafy 1-6: Morfologie hlavních (primárních) kořenů kukuřice pod vlivem kadmia. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$, $n = 3$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru (SE).

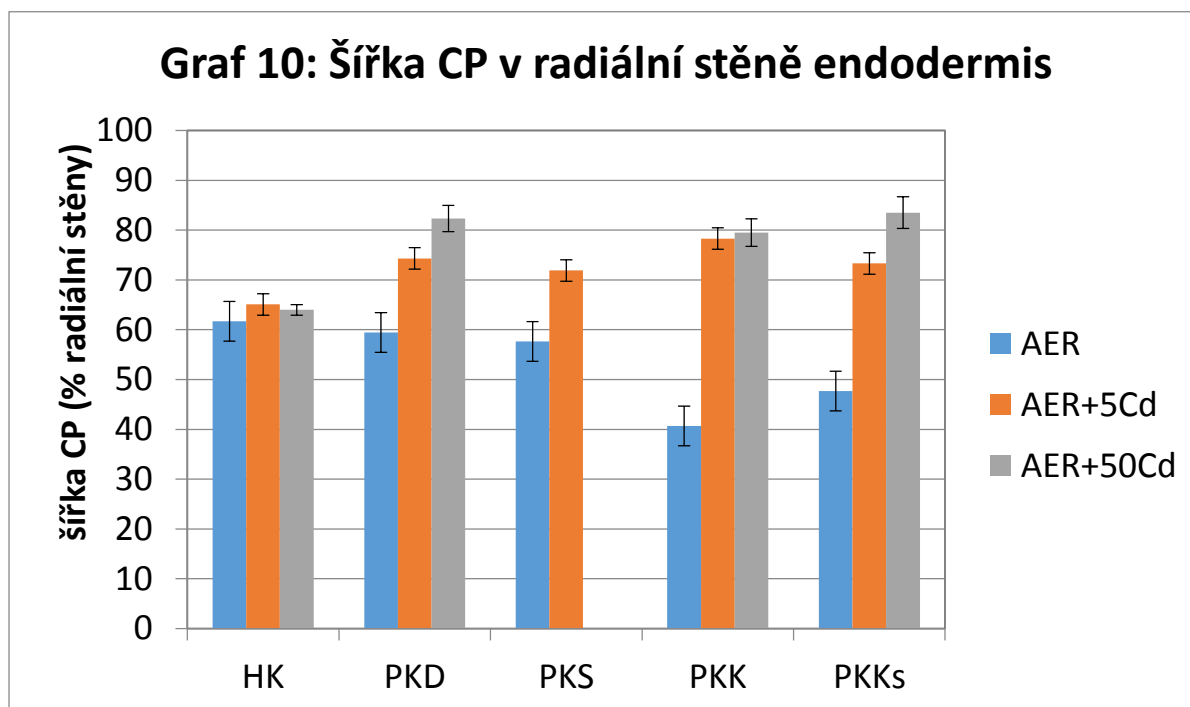


Grafy 7-9: Distribuce růstu postranních kořenů (PK) 1. řádu podél osy hlavního kořene (HK) pod vlivem kadmia. Osa hlavního kořene byla rozdělena na 2 cm segmenty a v každém z nich byl analyzován počet postranních kořenů 1. řádu, jejich průměrná délka a zastoupení krátkých (< 2 cm) postranních kořenů 1. řádu ($n = 3$).

10.1.2 Vývoj endodermis pod vlivem Cd

Dalším cílem bylo zjistit, jaký je stupeň vývoje endodermis v takto ovlivněných kořenech. Stupeň vývoje endodermální vrstvy byl porovnáván u hlavních kořenů a různých typů kořenů postranních (Obr. 9.3). Analyzovány byly vždy oblasti v blízkosti báze daného kořene, aby mohl být porovnán maximální stupeň vývoje endodermis v daném typu kořene. Pro zjednodušení kvantifikace byla pro hodnocení stupně vývoje bariér použita škála kategorií 0 – IV, podle výskytu dané struktury v rámci celé endodermální vrstvy (detaily viz Tab. 4). Pomocí barvení berberinem bylo ověřeno, že plně vyvinutá endodermální vrstva s **Casparyho proužky** se nacházela u všech postranních kořenů prvního řádu, tj. všechny spadaly do kategorie 4. Toto platilo pro všechny pěstované varianty (Tab. 14). Statistické hodnocení vlivu varianty nebo typu kořene na frekvenci výskytu endodermálních Casparyho proužků proto nebylo prováděno.

Šířka endodermálních Casparyho proužků byla nicméně ovlivněna nejenom přítomností kadmia, ale i typem kořene (Obr. 10.3; 10.4). Relativní šířka Casparyho proužků v buněčných stěnách (vyjádřená jako procenta z celkové délky radiální stěny) se mezi kontrolou a kadmiovými variantami téměř nelišila u hlavní osy kořene. Ovšem u postranních kořenů byl rozdíl mezi variantami kultivace patrný a nejvýraznější pak mezi krátkými postranními kořeny. U kadmiových variant zabíraly Casparyho proužky znatelně větší část radiální stěny endodermálních buněk (graf 10).



Graf 10: Šířka Casparyho proužků v procentech z celkové délky radiální stěny endodermální buňky. Data pocházejí z rostlin kontrolních, z 5 μM Cd a 50 μM Cd. HK-hlavní kořen; PKD – dlouhé postranní kořeny; PKS – středně dlouhé postranní kořeny; PKK a PKKs – krátké nevětvené postranní kořeny z ½ délky hlavní osy (PKK) a z báze hlavní osy (PKKs). Středně dlouhé postranní kořeny nebyly u 50 μM Cd vyvinuty, proto nebyly analyzovány. Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru (SE; $n = 3$).

Přítomnost **suberinových lamel** (Tab. 15), tedy 2. stupeň vývoje apoplastických bariér, byla také ovlivněna variantou kultivace (GLM, $p < 0,001$) i typem kořene (GLM, $p < 0,001$). Frekvence uložení suberinových lamel byla celkově nižší v krátkých postranních kořenech (PKK, PKK_s) oproti delším postranním kořenům (PKD) a hlavní ose, středně dlouhé postranní kořeny (PKS) se signifikantně nelišily (Tab. 15; Obr. 10.3; 10.4; GLM, Bonferroni test, $p > 0,05$).

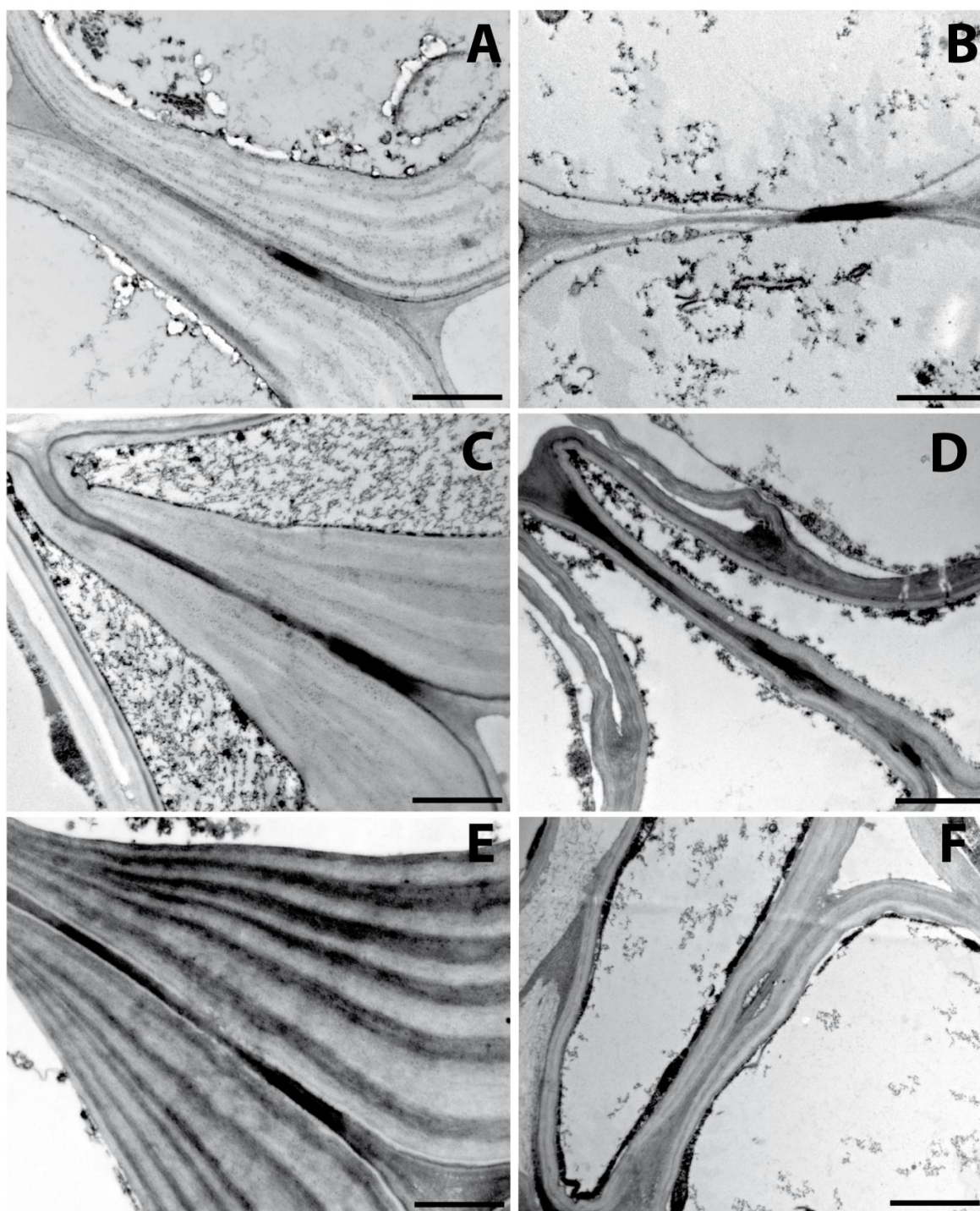
Casparyho proužky	HK	PKD	PKS	PKK	PKK_s
<i>AER</i>	IV	IV	IV	IV	IV
<i>AER+5Cd</i>	IV	IV	IV	IV	IV
<i>AER+50Cd</i>	IV	IV	IV	IV	IV

Suberinové lamely	HK	PKD	PKS	PKK	PKK_s
<i>AER</i>	III-IV	III-IV	II-III	0-I	0
<i>AER+5Cd</i>	IV	IV	III-IV	III-IV	II
<i>AER+50Cd</i>	IV	IV	n.d.	III-IV	0

Tab. 14 a 15: Tabulky ukazují frekvenci výskytu Casparyho proužků a suberinových lamel v buňkách endodermální vrstvy (kategorie 0 - IV viz Tab. 4). Kořeny pocházely z kontrolních podmínek, 5 μM Cd a 50 μM Cd. To je uvedeno u různých typů kořenů: hlavních (HK); dlouhých postranních (PKD); středně dlouhých postranních (PKS) a krátkých postranních kořenů z ½ délky hlavní osy kořene (PKK) a z báze hlavní osy kořene (PKKs) pěstovaných ve třech uvedených druzích podmínek. (n.d. = kořeny nevyvinuty).

Pod vlivem kadmia došlo oproti kontrole k zesílení trendu ukládání lamel (*Tab. 15*). Frekvence výskytu endodermálních buněk s uloženou suberinovou lamelou byla ve variantě s 5 μM Cd průkazně vyšší oproti kontrole a ve variantě s 50 μM Cd vyšší oproti oběma zbývajícím variantám (*Tab. 15*; GLM, Bonferroni test, $p < 0,05$). Markantní rozdíl v diferenciaci lamel pod vlivem kadmia byl prokázán především u postranních krátkých (PKK, PKK_s), naopak delší postranní kořeny (PKS, PKD) a hlavní osa kořene reagovala na kadmium méně výrazně (*Tab. 15*; GLM; interakce: $p = 0,008$).

Terciární stěny byly uloženy v endodermis všech tří variant. K masivnímu uložení došlo především u kořenů z 50 μM Cd. V této variantě byly terciární stěny přítomny i ve všech typech postranních kořenů, včetně těch nejkratších PKK (*Obr. 10.2*). Tyto struktury byly zdokumentovány pomocí TEM.



Obr. 10.2: Snímky z TEM ukazují uložení Casparyho proužků a terciárních stěn v endodermis u hlavního kořene (HK; obr. A, C, E) a nejkratších postranních kořenů (PKK; obr. B, D, F). Kořeny rostly v kontrolních podmínkách (A, B), přítomnosti 5 μM Cd (C, D) a 50 μM Cd (E, F). Měřítka odpovídá 1 μm .

10.1.3 Vývoj exodermis pod vlivem Cd

Na rozdíl od endodermální vrstvy, kde byly **Casparyho proužky** vyvinuty ve všech endodermálních buňkách ve všech variantách a u všech typů kořenů, v exodermis již tomu tak nebylo (*Tab. 16; Obr. 10.3; 10.4*). Frekvence výskytu exodermálních Casparyho proužků byla výrazně vyšší v hlavní ose kořene ve srovnání s postranními kořeny (GLM, $p < 0,001$). Naopak přidavek kadmia výskyt exodermálních Casparyho proužků ovlivnil méně (GLM, $p = 0,34$). Zatímco výskyt Casparyho proužků byl signifikantně vyšší ve variantě s $5 \mu\text{M}$ Cd oproti kontrole (GLM, Bonferroni test, $p < 0,05$). Tato reakce byla patrná spíše u delších postranních kořenů (PKD), ale celkově se jednotlivé typy kořenů v reakci na kadmium signifikantně nelišily (GLM, interakce: 0,32). Stejný trend nebyl pozorován ve variantě s $50 \mu\text{M}$ Cd (GLM, Bonferroni test, $p > 0,05$). U kořenů z $50 \mu\text{M}$ Cd se vyskytovaly specifické struktury poukazující na poškození vnitřních pletiv kořene - nahromaděná extracelulární hmota v mezibuněčných prostorech primární kůry a nepravidelná lignifikace primární kůry.

Relativní šířka existujících (diferencovaných) exodermálních Casparyho proužků (v % délky radiální stěny) byla signifikantně ovlivněna typem kořene (GLM, $p = 0,02$, *graf 11*), ale ne variantou kultivace (GLM, $p > 0,05$). Průkazně se od sebe lišila šířka Casparyho proužků v hlavních kořenech v porovnání s postranními kořeny (GLM; Bonferroni test, $p < 0,05$).

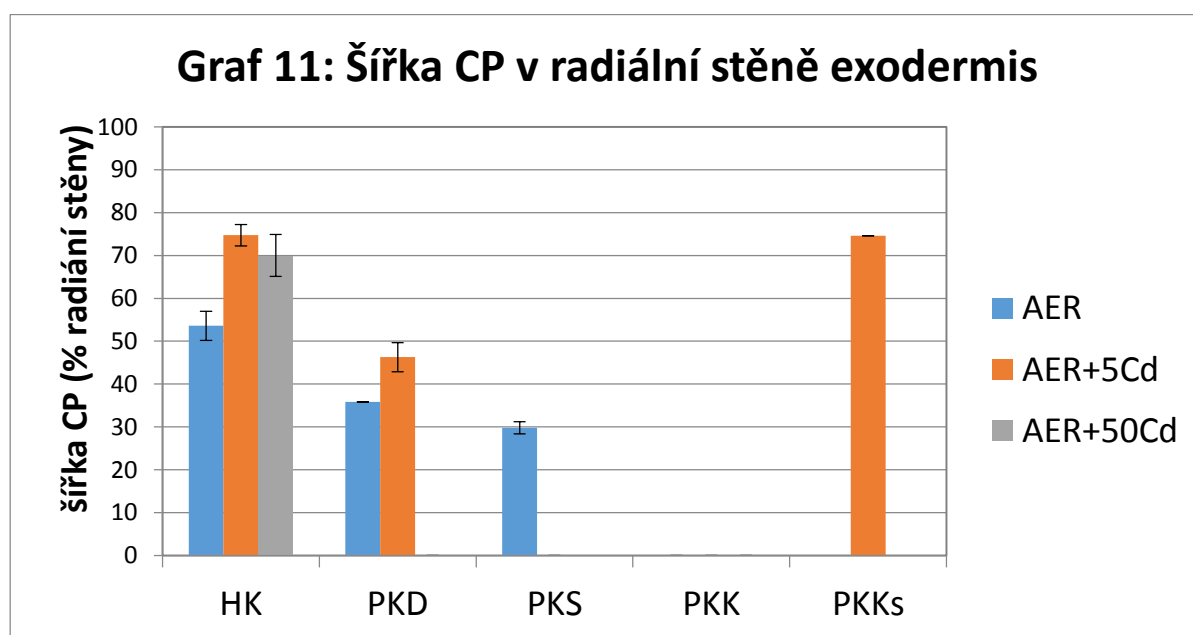
Vývoj **suberinových lamel** byl ovlivněn typem kořene (GLM, $p < 0,001$) ne však typem kultivace (GLM, $p > 0,05$). Hlavní osa kořene měla nejvyšší frekvenci výskytu suberinových lamel v buňkách exodermis, následovaná dlouhými (PKD) a středně dlouhými (PKS) postranní kořeny, které se dále signifikantně lišily od krátkých postranních kořenů (PKK a PKK_s; GLM; Bonferroni test, $p < 0,05$). Různé typy kořenů také reagovaly na přidavek kadmia odlišně (GLM, interakce: $p = 0,012$). V porovnání s kontrolou bylo ukládání suberinových lamel u $5 \mu\text{M}$ Cd rostlin posíleno spíše u hlavního kořene a nejdelších postranních kořenů (PKD). U kratších postranních kořenů rozdíl nebyl oproti kontrole tolik výrazný. U $50 \mu\text{M}$ Cd nebylo urychlení téměř pozorovatelné, k drobnému došlo pouze u hlavního kořene. Postranní kořeny téměř suberinové lamely nediferencovaly (*Tab. 17*) (*Obr. 10.3; 10.4*).

V exodermálních buňkách nedošlo k uložení **terciárních stěn** u žádné z pěstovaných variant.

Casparyho proužky	HK	PKD	PKS	PKK	PKK _s
AER	IV	0-I	I	0	I-II
AER+5Cd	IV	II-III	0	0-I	II-III
AER+50Cd	IV	0	n.d.	0	III-IV

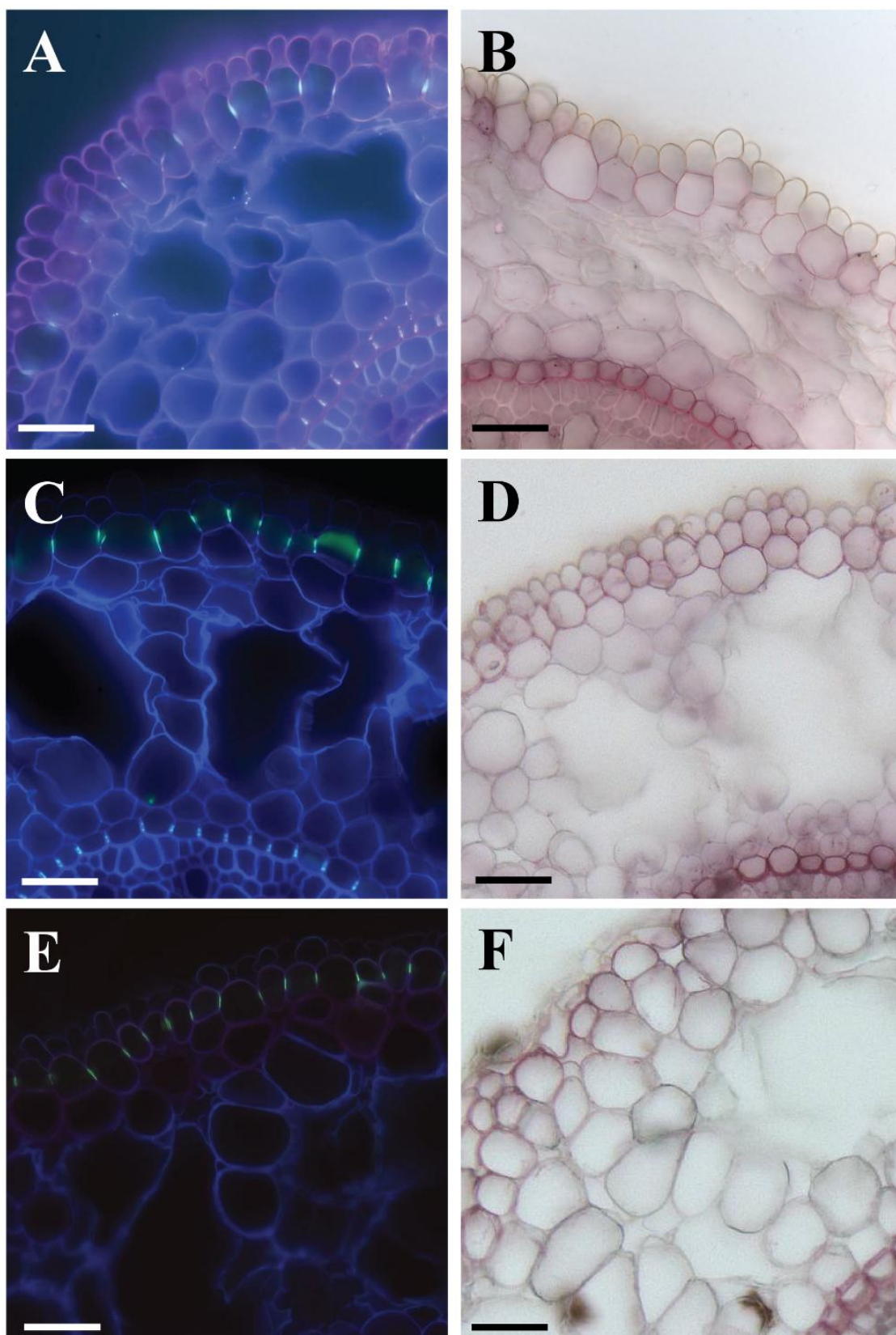
Suberinové lamely	HK	PKD	PKS	PKK	PKK _s
AER	III-IV	II-III	I-II	0	I-II
AER+5Cd	IV	III-IV	0-I	0-I	0-I
AER+50Cd	IV	I	n.d.	0-I	0

Tab. 16 a 17: Tabulky ukazují frekvenci výskytu Casparyho proužků a suberinových lamel v buňkách exodermální vrstvy (kategorie 0 - IV viz Tab. 4). Kořeny pocházely z kontrolních podmínek, 5 μM Cd a 50 μM Cd. To je uvedeno u různých typů kořenů: hlavních (HK); dlouhých postranních (PKD); středně dlouhých postranních (PKS) a krátkých postranních kořenů z 1/2 délky hlavní osy kořene (PKK) a z báze hlavní osy kořene (PKK_s) pěstovaných ve třech uvedených druzích podmínek. (n.d. = kořeny nevyvinuty).

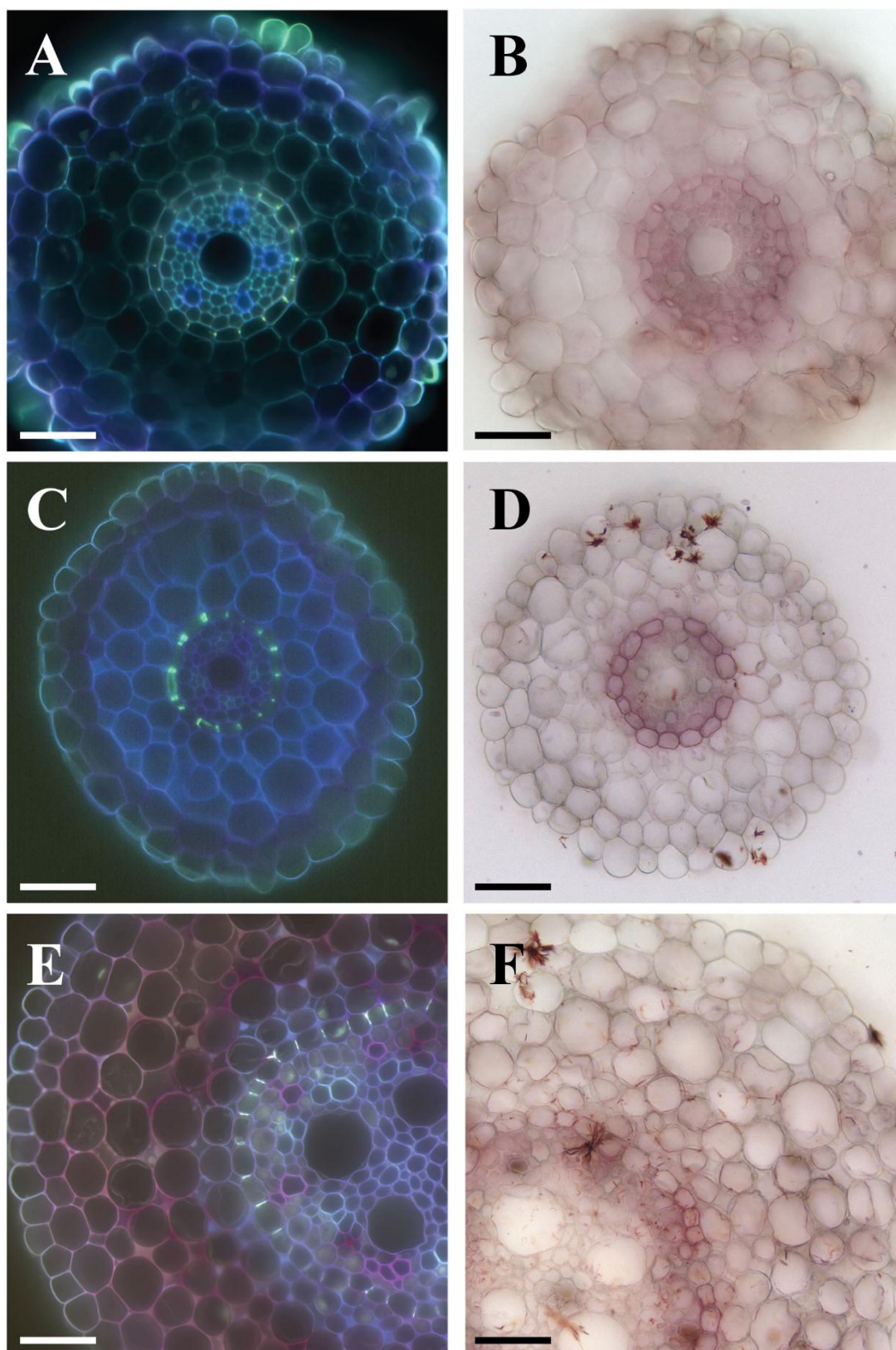


Graf 11: Šířku Casparyho proužků (CP) v procentech celkové délky radiální stěny exodermální buňky. Data pocházejí z rostlin kontrolních, z 5 μM Cd a 50 μM Cd. HK - hlavní

kořen; PKD - dlouhé postranní kořeny; PKS - středně dlouhé postranní kořeny; PKK a PKKs - krátké nevětvené postranní kořeny z 1/2 délky hlavní osy (PKK) a z báze hlavní osy (PKKs). Analyzovány byly pouze délky existujících Casparyho proužků. Tam, kde hodnoty chybí, se proužky v exodermis nenacházely. Proto nebylo možné jejich délku změřit. Středně dlouhé postranní kořeny nebyly u 50μM Cd vyvinuty. Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru (SE; n = 3).



Obr 10.3 : Obrázky ukazují exodermis a endodermis v hlavních kořenech kukuřice. Obrázky A, C, E ukazují Casparyho proužky, obrázky B, D, F suberinové lamely. Porovnány jsou kořeny z kontrolních podmínek (A, B), 5 μM Cd (C, D) a 50 μM Cd (E, F). Měřítka odpovídá 50 μm .



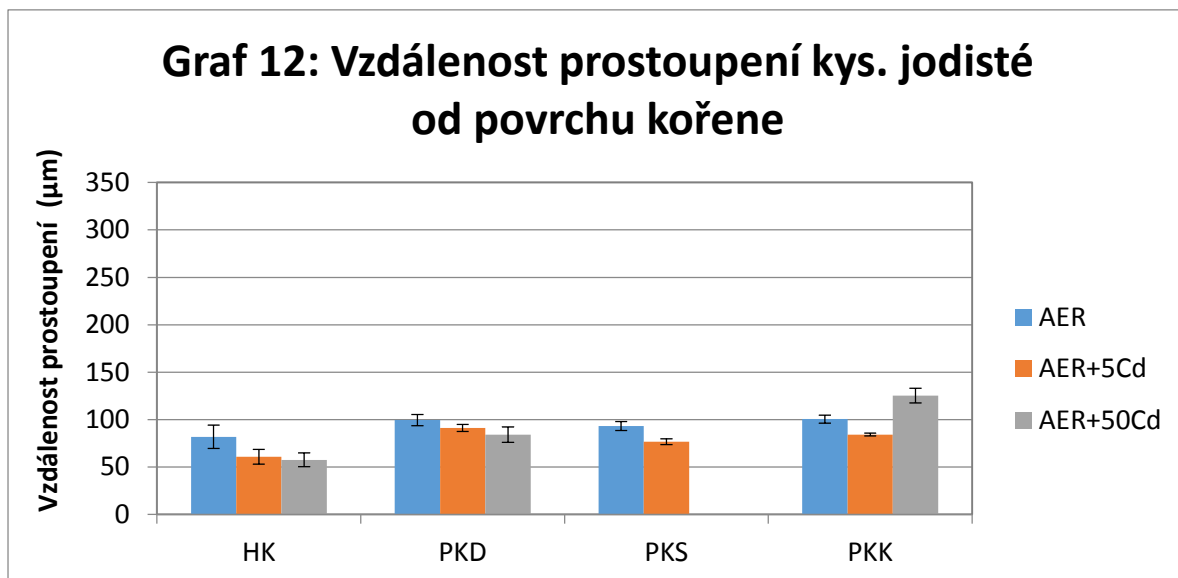
Obr 10.4: Obrázky ukazují exodermis a endodermis v krátkých postranních kořenech kukuřice (PKK). Obrázky A, C, E ukazují Casparyho proužky, obrázky B, D, E suberinové lamely. Porovnány jsou kořeny z kontrolních podmínek (A, B), 5 μM Cd (C, D) a 50 μM Cd (E, F). Měřítko odpovídá 50 μm .

10.1.4 Propustnost apoplastu povrchových vrstev kořenů

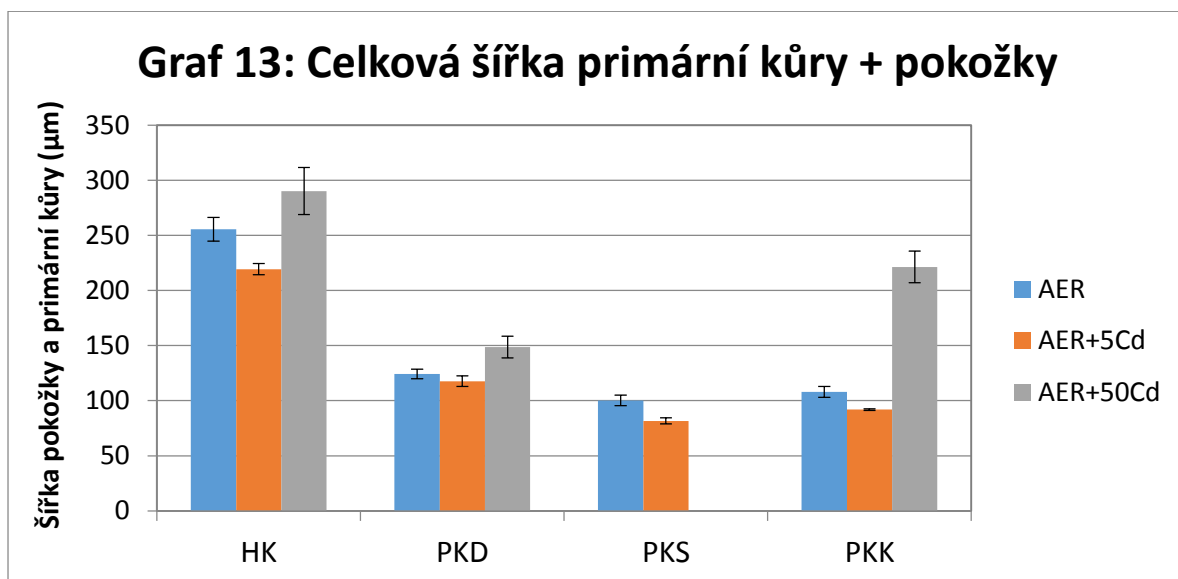
K otestování propustnosti povrchových vrstev kořene byla jako apoplastická sonda použita 0,1% kys. jodistá. Tato látka se z roztoku pohybovala apoplastem intaktních kořenů a následně byla její poloha detekována na řezech (viz kap. 9.2.4). Propustnost byla vyjádřena jako absolutní vzdálenost od povrchu kořene (μm), kam se sonda dostala za 30 min (*graf 12*), nebo jako relativní podíl primární kůry kořene + pokožky zasažený přítomností sondy (%; *graf 14*) z celkové šířky těchto dvou vrstev (*graf 13*).

Ze statistiky vyplývá, že na propustnost kořenů měla přítomnost kadmia vliv (GLM; Bonferroni test, $p < 0,05$). U osy hlavního kořene (HK) a v menší míře také u dlouhých a středně dlouhých postranních kořenů (PKD a PKS) platil obecný předpoklad, že čím více stresované rostliny byly, tím kratší vzdálenost sonda kořenem za 30 min urazila, tj. propustnost do kořenů byla snižena. V krátkých postranních kořenech (PKK) byl tento trend patrný pouze mezi variantou kontrolní a variantou s $5 \mu\text{M}$ koncentrací kadmia. Ve variantě s $50 \mu\text{M}$ koncentrací kadmia však byla vzdálenost podstatně delší (*graf 13*).

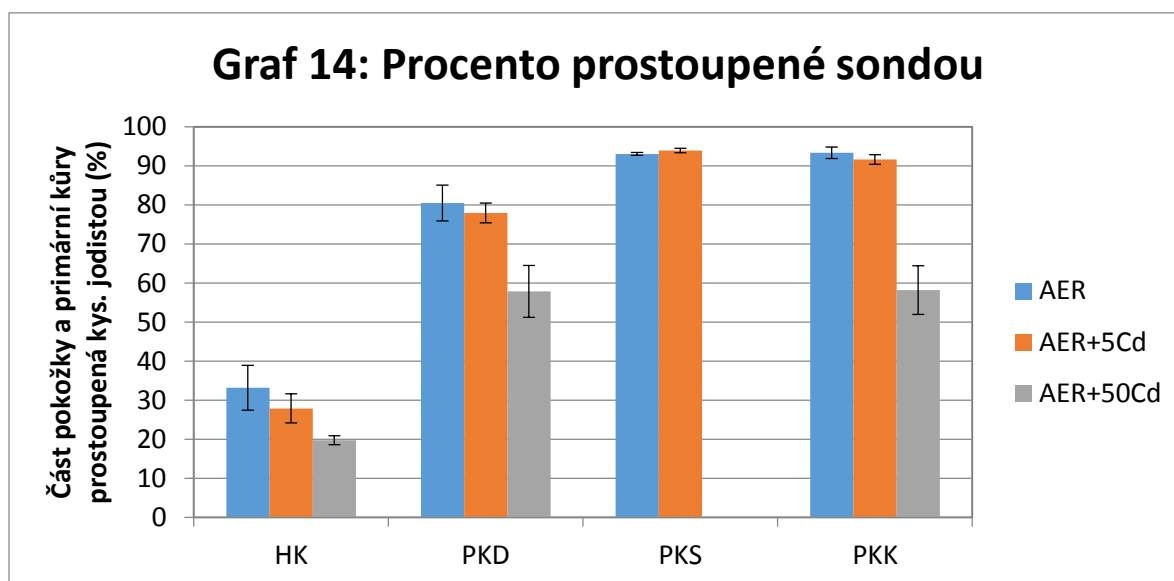
Krátké postranní kořeny (PKK) byly ve variantě s $50 \mu\text{M}$ koncentrací kadmia výrazně silnější než PKK v ostatních dvou variantách (*graf 13*). Proto byl pohyb sondy vyjádřen také jako procento šířky primární kůry + pokožky zasažené sondou z celkové šířky těchto dvou vrstev (*graf 14*). Tento parametr byl průkazně ovlivněn typem kořene (GLM; $p < 0,001$) i přítomností kadmia (GLM; $p < 0,001$). Rozdílná odpověď různých typů kořenů na variantu však těsně prokázána nebyla (GLM; interakce: $p = 0,054$). Procento bylo nejnižší u osy hlavního kořene a rostlo směrem k nejkratším postranním kořenům (*graf 14*; *Obr. 10.5*). V procentu probarvení se od sebe průkazně lišily hlavní kořeny (HK) a nejdelší postranní (PKD). Od obou těchto typů kořenů se navíc lišily kořeny nejkratší (PKK; GLM; Bonferroni test, $p > 0,05$). Samotná šířka kořenů tedy také ovlivňuje, jak daleko se v kořeni sonda (příp. polutant) dostane.



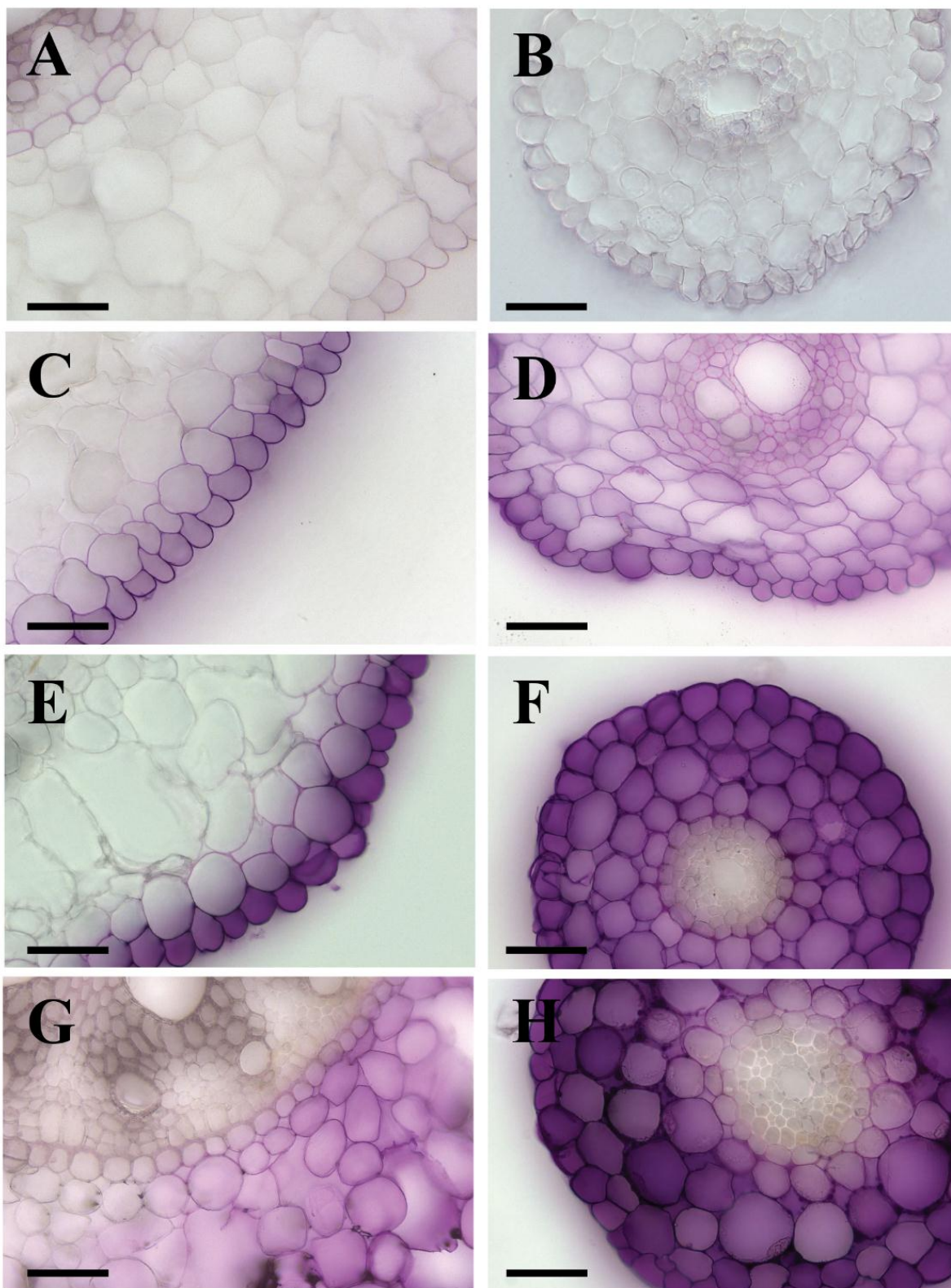
Graf 12: Propustnost kořene vyjádřená absolutní vzdáleností, kam pokožkou a primární kůrou prostoupila apoplastická sonda (kys. jodistá) za dobu 30 minut. Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru (SE; $n = 3$).



Graf 13: Celková šířka kořenů, u nichž bylo sledováno prostoupení PI pletivy za dobu 30 minut. Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru (SE; $n = 3$).



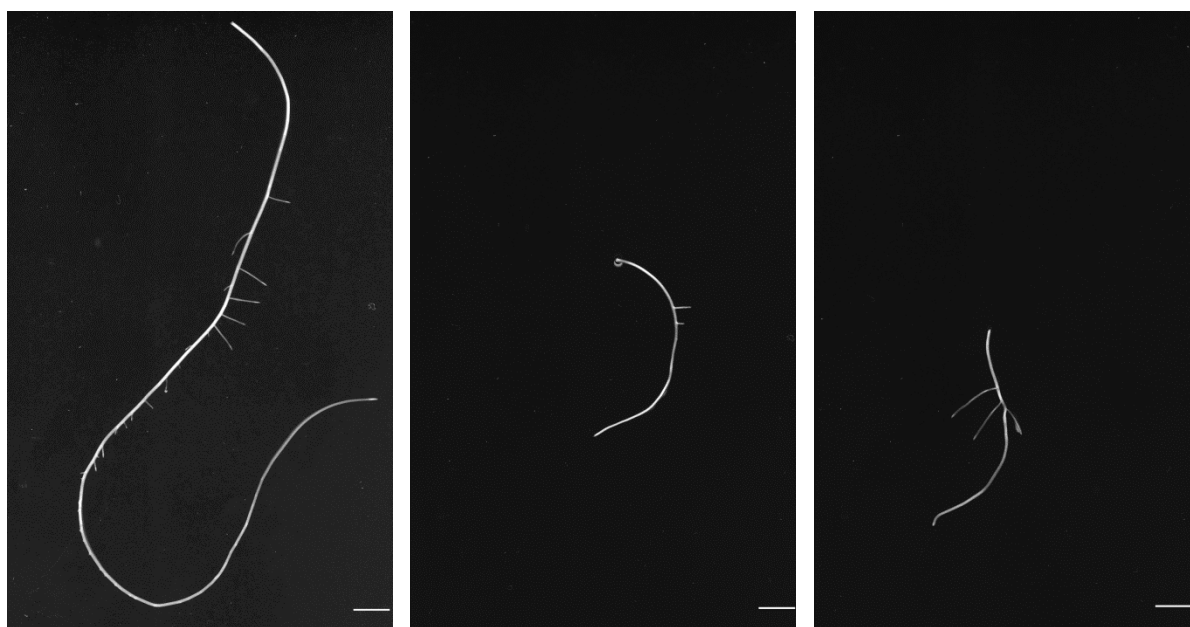
Graf 14: Propustnost kořene vyjádřená jako relativní podíl pokožky a primární kůry zasažený sondou PI. To je vyjádřeno jako procenta z celkové šířky kořene. Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru (SE; $n = 3$).



Obr. 10.5: Obrázky ukazují rozdíly v propustnosti hlavních (HK; obr. A, C, E, G) a nejkratších postranních kořenů (PKK; obr. B, D, F, H) kukuřice. Fialová barva ukazuje, kam až prostoupila apoplastická sonda – kyselina jodistá za dobu 30 min. Obrázky (A, B) ukazují negativní kontrolu (bez aplikace kys. jodisté), obrázky (C, D) kontrolní variantu ošetřenou k. jodistou, obrázky (E, F) kořeny z 5 μM Cd ošetřené k. jodistou a obrázky (G, H) kořeny z 50 μM Cd ošetřené k. jodistou. Měřítka odpovídá 50 μm .

10.2 Vliv kadmia a hypoxie na diferenciaci apoplastických bariér v kořeni cibule (Experiment 2)

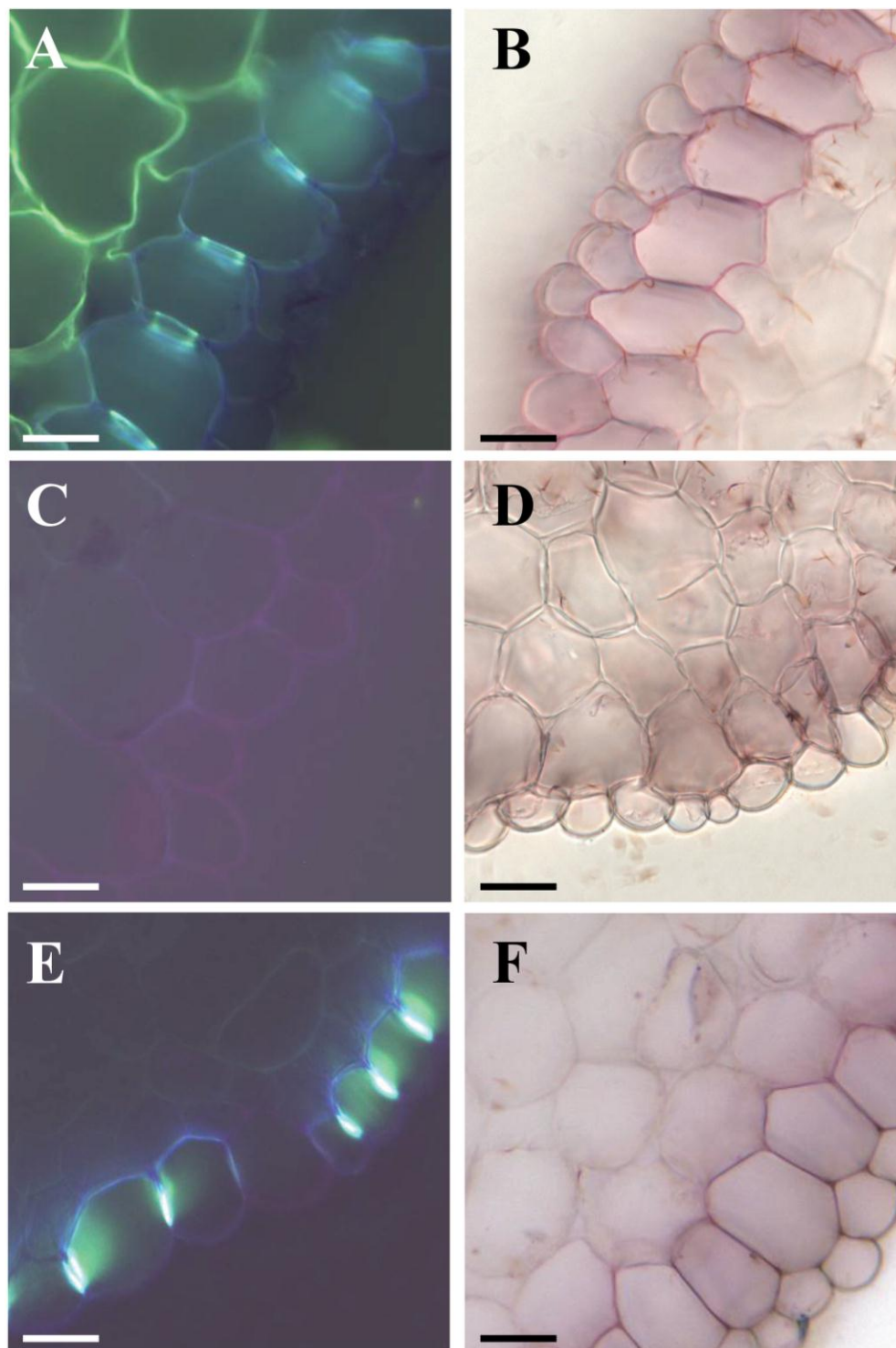
Rostliny cibule byly pěstovány pro ověření vlivu toxicity kadmia u jiného rostlinného druhu a zároveň otestování kombinovaného vlivu dvou stresových faktorů – kadmia a hypoxie. Kontrolní podmínky byly stejné jako u rostlin kukuřice (provzdušňovaná hydroponie – varianta AER), dále byly zkoumány kořeny z neprovzdušňované varianty (STAG) a neprovzdušňované s přidavkem 5 μM Cd (STAG + 5Cd). Byly analyzovány vybrané adventivní kořeny. Po morfologické stránce byly kořeny v kontrolní variantě dobře vyvinuté s přítomnými postranními kořeny prvního řádu. Kořeny z neprovzdušňované varianty byly vyvinuty nejhůře, postranní kořeny se u nich vyskytly jen velmi sporadicky. Kořeny z neprovzdušňované varianty s přítomností Cd vypadaly vizuálně lépe než neprovzdušňovaná varianta bez Cd (Obr. 10.6). Detailní morfologická analýza kořenů však nebyla prováděna.



Obr 10.6: Naskenované kořeny cibule (*Allium cepa*) z kontrolních podmínek (vlevo), neprovzdušňované hydroponie (uprostřed) a neprovzdušňované hydroponie + 5 μM Cd (vpravo). Měřítka odpovídá 2 cm.

V kořenech z kontrolní varianty a varianty kombinující hypoxii s kadmiem byly přítomny jak Casparyho proužky, tak suberinové lamely v endodermální i exodermální vrstvě. Exodermální Casparyho proužky však byly v přítomnosti kadmia masivněji lignifikovány (Obr. 10.4). Naproti tomu, u kořenů z neprovzdušňované hydroponie byly tyto modifikace přítomny pouze

v endodermální vrstvě. V exodermis Casparyho proužky a suberinové lamely nebyly pozorovány (Obr. 10.7).



Obr. 10.7: Obrázek ukazuje Casparyho proužky (A, C, E) a suberinové lamely (B, D, F) kořenů cibule v kontrolní variantě (A, B), ve stagnantní hydroponii (C, D) a ve stagnantní hydroponii s přidavkem 5 μM Cd (E, F). Měřítka odpovídá 50 μm .

10.3 Analýza exprese genů *ZmCASP* u kukuřice (Experiment 3)

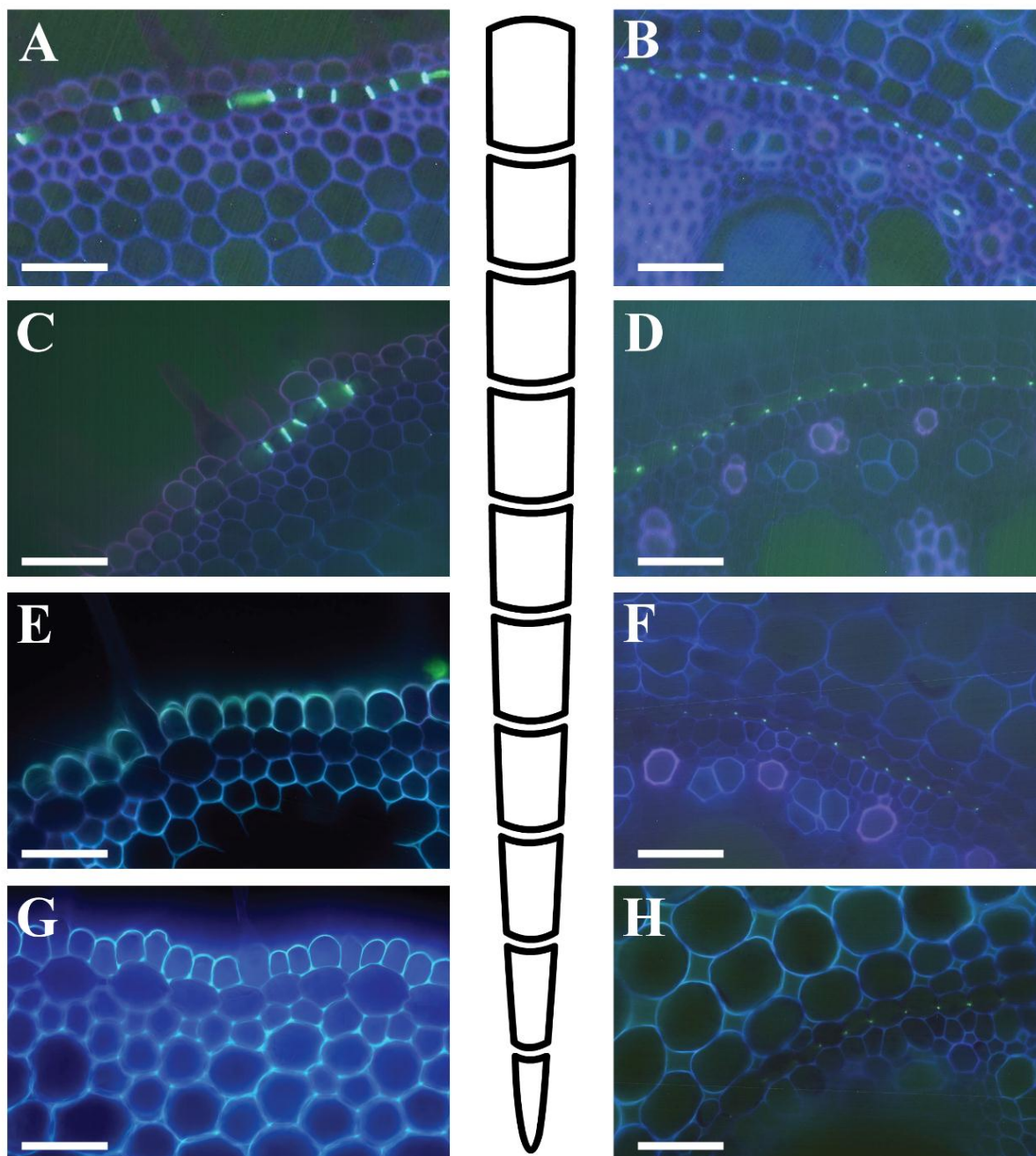
Jak již bylo uvedeno, u modelového organismu *Arabidopsis thaliana* byla prokázána role genů rodiny *CASP* při vzniku endodermálních Casparyho proužků (Roppolo et al. 2011; Roppolo et al. 2014). Jejich zapojení ve vývoji bariér u jiného rostlinného druhu a především v exodermis však dosud prokázáno nebylo. Z těchto poznatků vycházel experiment č. 3 provedený v rámci diplomové práce. Jelikož práce byla zaměřena především na vývoj exodermální vrstvy, byla prováděna na kukuřici, která tuto vrstvu na rozdíl od *Arabidopsis* ve svých kořenech tvoří. Z hlediska dobré a rychlé dostupnosti materiálu byly pro experiment využívány nodální kořeny (Obr. 9.4). Základem této analýzy bylo propojení čistě anatomického sledování vývoje apoplastických bariér s molekulárním vzhledem do této problematiky, vycházejícím z článku (Roppolo et al. 2014). Cílem bylo především prokázat korelaci mezi vývojem exodermis a expresí genů *ZmCASP* v nodálních kořenech kukuřice.

10.3.1 Anatomická analýza nodálních kořenů

Prvotní myšlenkou bylo zaměřit se na nodální kořeny, které rostly částečně nad hladinou kultivačního roztoku a posléze se ponořily. Tyto rozdílné kultivační podmínky sice ovlivnily rozsah diferenciaci exodermis v těchto kořenech, ale nedošlo k úplnému přepnutí programu vývoje exodermis (změny ano x ne), kterou by šlo využít ke snadné detekci rozdílu v expresi *ZmCASP* genů v závislosti na rozdílném programu vývoje povrchových vrstev kořene. Jelikož se tedy u napůl vynořených kořenů neprokázal efekt na vznik bariér, který byl očekáván, nebyly nadále využívány. Pro izolaci mRNA se tedy jako nejlepší ukázaly nodální kořeny zcela ponořené do vody. Byly odebrány vždy mladé nodální kořeny o délce cca 10 cm.

U těchto kořenů byla provedena detailní analýza diferenciaci bariér pro korelaci s expresí genů *ZmCASP* ve stejném materiálu. Kořen byl rozdělen na centimetrové segmenty a z nich byly analyzovány pozice ze vzdálenosti 2, 4, 6, 8 a 10 cm od kořenové špičky. Řezy z těchto pozic byly histochemicky obarveny a byl pozorován stupeň vývoje apoplastických bariér v jednotlivých segmentech (Obr. 10.8). Endodermis se vyskytovala již v segmentu z 2 cm délky za špičkou. Byla přítomna ve stavu drobných teček, které se v dalších segmentech již neměnily (Obr. 10.8). Exodermální vrstva procházela lépe zachytitelným vývojem. V segmentech ze 2 a 4 cm nebyla exodermis pozorovatelná. V oblasti segmentu ze 6 cm došlo náhle prudkému skoku ve vývoji. Exodermis byla u většiny kořenů z této vzdálenosti vyvinutá u poloviční až nadpoloviční většiny buněk. Již zde se nacházející Casparyho proužky byly dlouhé, zabírající

většinu délky radiálních stěn buněk (Obr. 10.8). V segmentech z 8 cm již byly proužky vyvinuty u 90 – 100% buněk (Obr. 10.8).

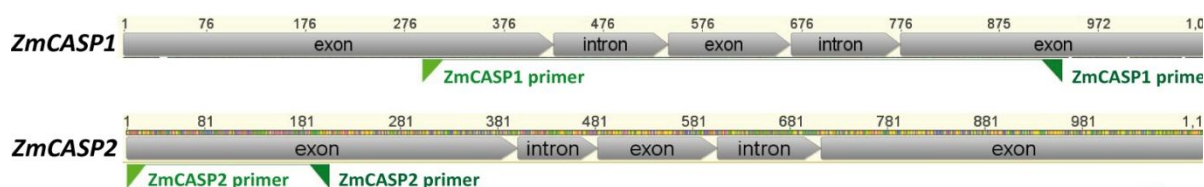


Obr. 10.8: Stupeň vývoje Casparyho proužků v exodermis (A, C, E, G) a endodermis (B, D, F, H) v nodálních kořenech kukuřice. K anatomické analýze byly použity segmenty ze vzdálenosti 2 cm (G, H), 4 cm (E, F), 6 cm (C, D) a 8 cm (A, B) od kořenové špičky. Ve vzdálenosti 2, 4, 6 i 8 cm tvořila endodermis malé tečky (H, F, D, B). Exodermis nebyla přítomna ve vzdálenosti 2 a 4 cm (G, E). Ve vzdálenosti 6 cm už byl patrný prudký zlom

v diferenciaci exodermis (C). Ve vzdálenosti 8 cm od špičky již exodermis tvořila vyvinuté Casparyho proužky. Měřítko odpovídá 50 μ m.

10.3.2 Ověření detekce cílové sekvence ZmCASP1 a ZmCASP2

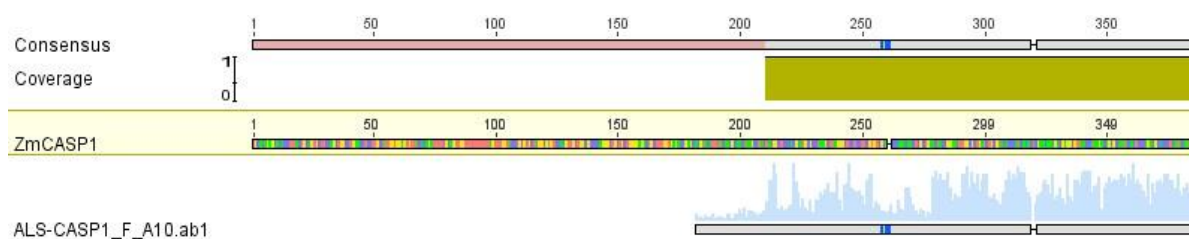
Analýza exprese cílových genů *ZmCASP1* a *ZmCASP2* byla provedena izolací mRNA z vybraných segmentů nodálních kořenů kukuřice. Izolovaná mRNA byla ošetřena DNazou a pomocí RT-PCR s oligoT primery převedena na cDNA. Z cDNA byly následně amplifikovány úseky cílových sekvencí pomocí PCR a izolovány gelovou elektroforézou. Byly použity specifické primery navržené podle sekvencí cílové mRNA (podrobněji viz kap. 9.4.3., pozice nasedání primerů k cílové sekvenci ukazuje Obr. 10.9). Prováděna byla vždy i kontrola bez přidání vzorku cDNA. Jako reference byly použity geny pro β -tubulin (b-tub) a elongační faktor 1a (Lin et al. 2014).

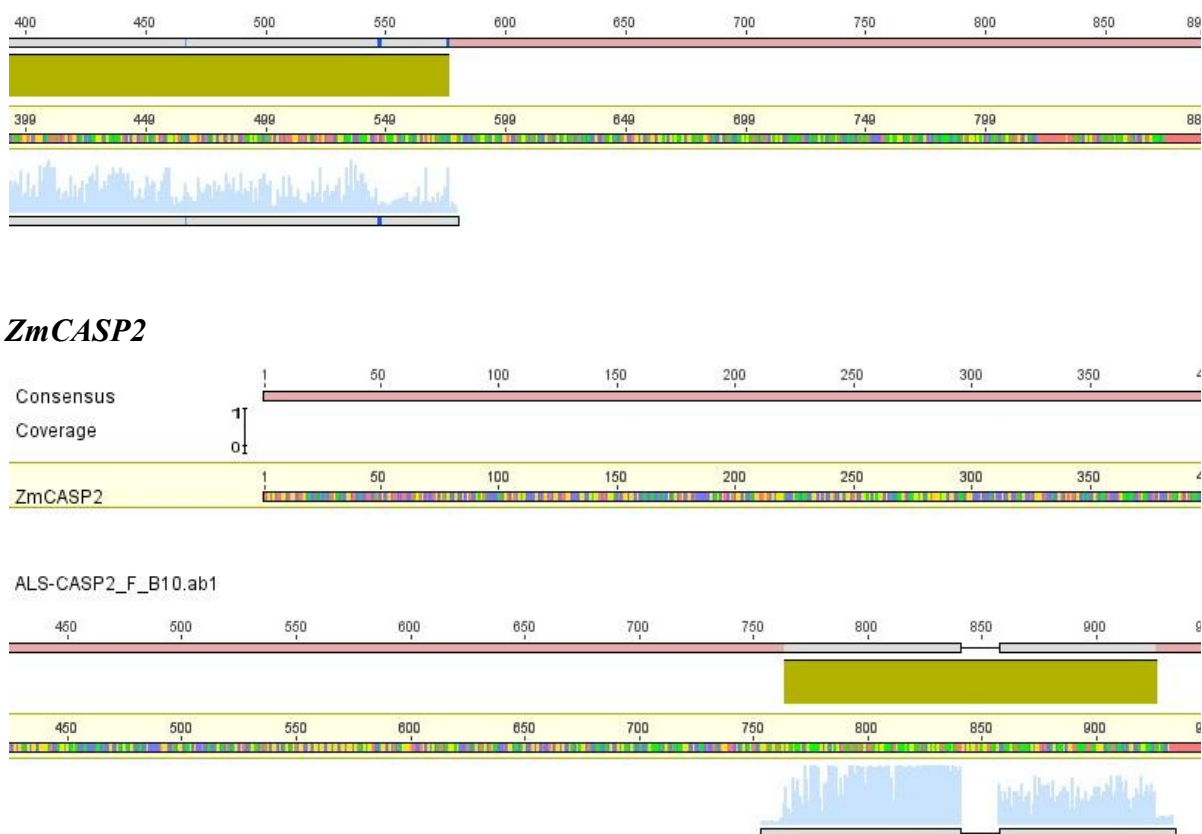


Obr. 10.9: Navržení specifických primerů pro geny *ZmCASP1* a *ZmCASP2*.

Použité primery byly vždy nejprve otestovány na genomové DNA izolované taktéž z nodálních kořenů kukuřice. S pomocí sekvenace bylo ověřeno, že fragmenty izolované po amplifikaci z cDNA pomocí primerů specifických pro *ZmCASP1* a *ZmCASP2* odpovídají sekvenci cílových transkriptů. U obou sledovaných gelů sekvence až na malé odchylky odpovídaly (Obr. 10.10).

ZmCASP1





Obr. 10.10: Analýza shody sekvenční mRNA cílového genu (dle databáze ENA) a sekvenční získané sekvenací produktu amplifikace z cDNA po izolaci z nodálních kořenů kukuřice (pro *ZmCASP1* označena jako *ALS-CASP1_F-A10.ab1*; pro *ZmCASP2* označena jako *ALS-CASP2_F-B10.ab1*). Šedý obdélník označuje shodné sekvenční, modré obdélníky uvnitř něj části sekvenční, které jsou odlišné. Obrázky jsou výstup z programu Geneious 6.1.7.

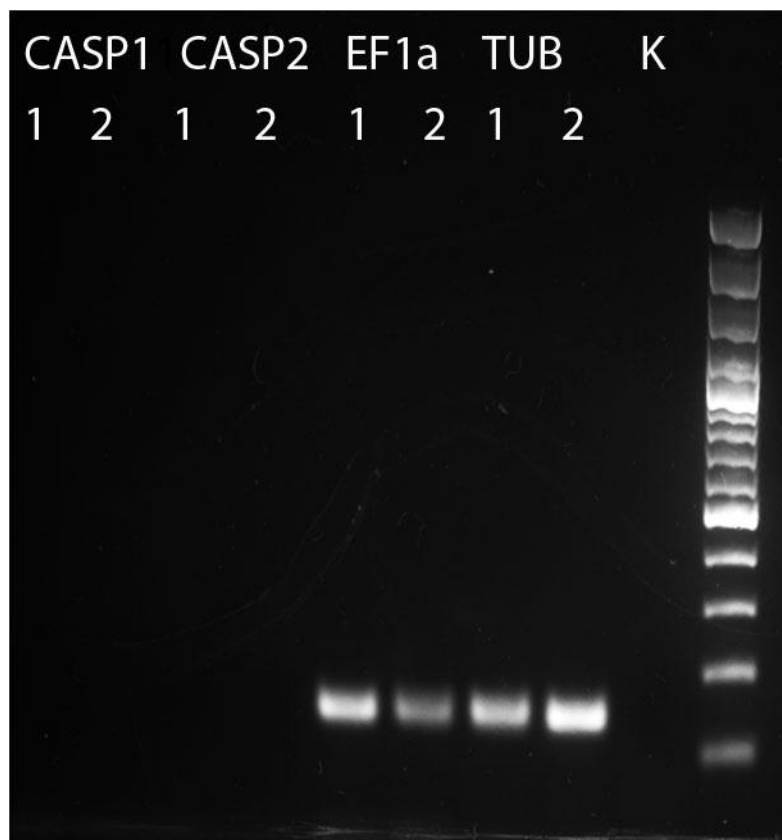
10.3.3 Exprese genů *ZmCASP* v segmentech nodálních kořenů

Pozice blízko špičky

Jako první byla mRNA izolována z těsné blízkosti špičky kořene, tj. ze segmentů ze vzdáleností:

- 1) 0 – 3 mm vzdálenosti od špičky
- 2) 3 – 6 mm vzdálenosti od špičky

Přestože tyto vzorky obsahovaly celý segment kořene (endodermální i exodermální vrstvu), nebyla v těchto vzdálenostech zachycena exprese *ZmCASP1* ani *ZmCASP2*, ačkoli referenční geny se podařilo zachytit (Obr. 10.11). Tento výsledek vedl k tomu, aby bylo postupováno dále po ose kořene směrem k bázi.



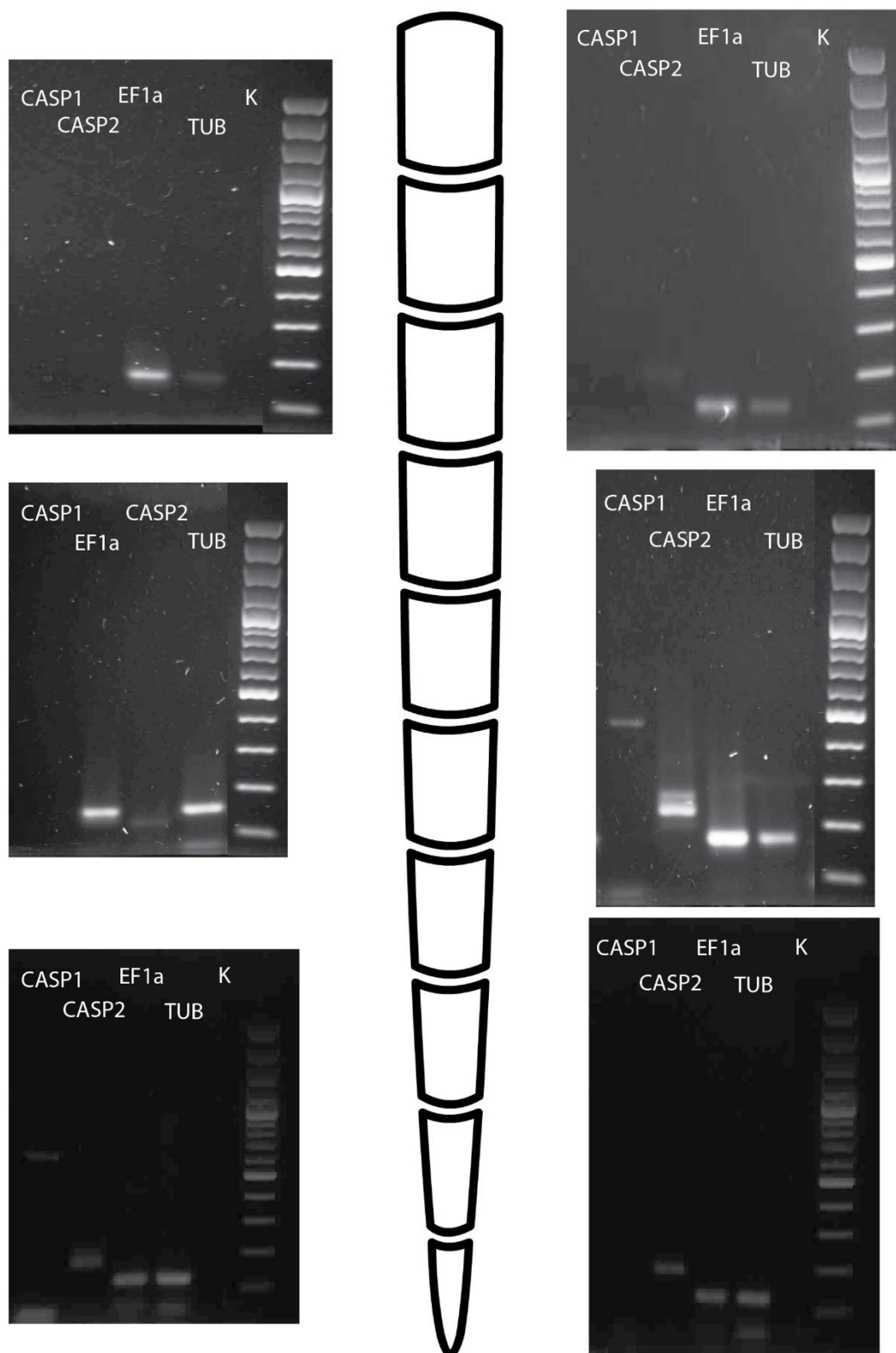
Obr. 10.11: Produkty PCR ze vzorků nodálních kořenů blízko kořenové špičky: 1) 0-0,3mm od špičky; 2) 0,3-0,6mm od špičky. CASP1,2 – ZmCASP1 a ZmCASP2; EF1a –elongační faktor 1a a TUB – β -tubulin (referenční geny); K – kontrola bez přídavku cDNA

Pozice výše na kořenové ose

Vzhledem k tomu, že při odběru materiálu nodálních kořenů byly vybrané segmenty (1, 3, 5, 7 a 9 cm od špičky) pod binolupou rozděleny tak, aby jedna část obsahovala pouze exodermální a druhá pouze endodermální vrstvu, probíhaly následné analýzy exprese vždy zvlášť pro exodermis a endodermis. Tím došlo ke zvýšení přehlednosti a výpovědní hodnoty experimentu.

Expresa ZmCASP v endodermis

Expresa genů *ZmCASP1* a *ZmCASP2* byla sledována u jednotlivých segmentů směrem od kořenové špičky k bázi. V segmentu 1 cm od báze byly zachyceny transkripty obou sledovaných genů (*Obr. 10.12*). *ZmCASP1* v tomto úseku vykazoval slabší odezvu. *ZmCASP2* vykazoval odezvu větší. V segmentu 3 cm od báze vykazoval odezvu jen *ZmCASP2* (*Obr. 10.12*). V segmentu 5 cm od báze byly v endodermis zachyceny již jen referenční geny pro β -tubulin a elongační faktor 1a (*Obr. 10.12*).



Obr. 10.12: Obr. Produkty amplifikace z cDNA izolovaných z jednotlivých segmentů nodálních kořenů - endodermis (vlevo) a exodermis (vpravo). Segment 1 cm (spodní dva gely), 3 cm (gely uprostřed) a 5 cm od kořenové špičky (gely nahoře). CASP1;2 – ZmCAAP1 a ZmCASP2; EF1a – elongační faktor 1a; TUB – β -tubulin (referenční geny); K – kontrola bez přídavku cDNA

Exprese *ZmCASP* v exodermis

Exprese *ZmCASP* genů se v exodermis od endodermis lišila. Ve vzdálenosti 1 cm od báze byla v exodermis zachycena pouze exprese genu *ZmCASP2*. Exprese *ZmCASP1* v této vzdálenosti od špičky nebyla pozorovatelná (Obr. 10.12). Ve vzdálenosti 3 cm od špičky došlo k expresi obou sledovaných genů. Exprese genu *ZmCASP1* byla nižší a méně výrazná. Exprese genu *ZmCASP2* byla silnější (Obr. 10.12). Ve vzdálenosti 5 cm od špičky nebyla pozorovatelná exprese ani jednoho ze sledovaných genů, přestože transkripty pro referenční geny byly zachyceny (Obr. 10.12).

10.3.4 Korelace exprese genů *ZmCASP* s anatomickou analýzou kořenů

Zachycená exprese sledovaných genů se tedy mezi oběma vrstvami lišila. To se týkalo především vzdálenosti 1 a 3 cm od kořenové špičky. *ZmCASP1* byl v endodermis zachycen již ve 1 cm vzdálenosti, u exodermis až ve vzdálenosti 3 cm. Co se týče genu *ZmCASP2*, ten se nacházel v úseku 1 cm od špičky ve vzorcích z endodermální i exodermální vrstvy. Ovšem u exodermis vykazoval ve vzdálenosti 1 cm expresi menší a v úseku ze 3 cm se ještě zvýšila. V úseku ze vzdálenosti 5 cm od špičky již nebyla zachycena exprese genů *ZmCASP1* a *ZmCASP2* ani endodermálním, ani v exodermálním vzorku.

Výsledky, které byly získány analýzou exprese, byly porovnány s výsledky anatomické analýzy. Vývoj endodermis viditelný díky histochemické analýze koreloval s expresí *ZmCASP* genů. Bylo patrné, že vývoj této vrstvy podle barvení začal velmi blízko kořenové špičky, čemuž odpovídal i brzký výskyt exprese genů *ZmCASP1* a *ZmCASP2*. Vývoj Casparyho proužků v exodermální vrstvě započal později. Pravděpodobně kolem 2 – 3 cm od špičky, více až kolem 4 cm od špičky, a právě v této vzdálenosti byla i exprese obou sledovaných genů nejvýraznější. U exodermis měla diferenciace Casparyho proužků rychlý průběh právě v oblasti 4 – 6 cm od špičky. Ve vzdálenosti 5 cm od špičky už exprese nebyla patrná v žádné z vrstev, stejně tak nebyly patrné změny ve vývoji po anatomické stránce.

11. Diskuze

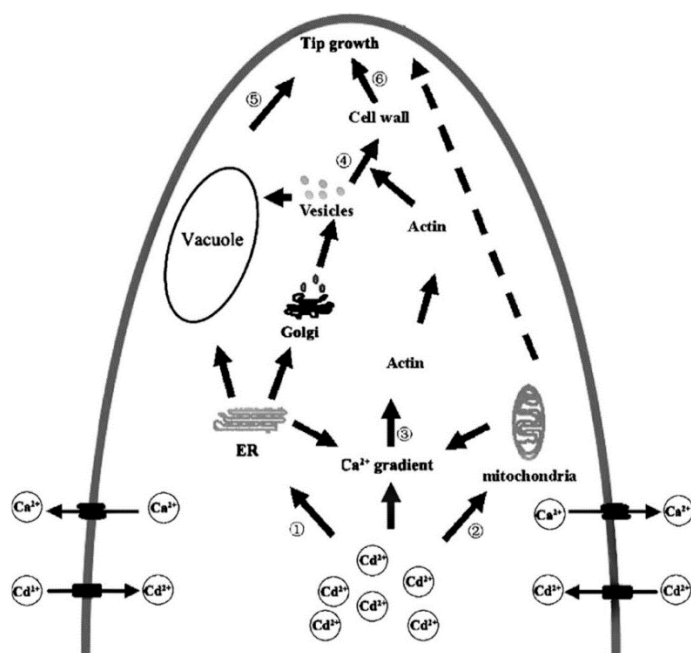
11.1 Vliv toxicity kadmia na růst primárního kořene kukuřice

Prvním cílem diplomové práce bylo podrobně analyzovat vliv toxicity kadmia na růst a větvení primárního kořene kukuřice *Zea mays*. Kadmium se řadí mezi nejtoxičtější těžké kovy, které negativně ovlivňují životní prostředí. Má toxické účinky nejen na rostliny, ale i živočichy a člověka. Nejčastější cestou, jak se Cd dostává do potravy, je právě přes rostliny (Herbette et al. 2006; Wan a Zhang 2012). Je to prvek, u něhož zatím nebyla zjištěna žádná prospěšná funkce pro rostliny. Jedinou výjimkou je funkce v karbonanhydráze mořské rozsivky *Thalassiosira weissflogii* (Lane a Morel 2000). Koncentrace kadmia v neznečištěných půdách se pohybuje od 0,04 – 0,32 μM Cd, středně kontaminované půdy obsahují 0,32 – 1 μM Cd. Vysoce kontaminované půdy obsahují až 35 μM Cd^{2+} , přežijí na nich jen rostliny hyperakumulující Cd (Sanità di Toppi a Gabbrielli 1999; Fusconi et al. 2007). V experimentech se koncentrace pohybují ve vyšších číslech, například 50 μM až 500 μM CdCl_2 (Seregin et al. 2004; Fusconi et al. 2007; Lux et al. 2011). S ohledem na tyto koncentrace byly pro experimenty v této diplomové práci zvoleny dvě koncentrace kadmia (5 a 50 μM).

Jak bylo patrné i z experimentu č. 1, Cd způsobilo výrazné změny v morfologii primárního kořene. Mělo dopad na růst a délku kořenů, jak hlavní osy kořene, tak kořenů postranních. Kořeny vystavené Cd byly kratší a pokroucenější (*Obr. 10.1*). Celkově se počet postranních kořenů s rostoucí koncentrací Cd snižoval. V 50 μM koncentraci kadmia už se nevyskytovaly postranní kořeny 2. řádu a také počet postranních kořenů 1. řádu byl snížen na 7 % oproti kontrolní variantě. Celková délka postranních kořenů byla v této variantě pouze 5 % oproti kontrole. Nižší koncentrace kadmia (5 μM) ovlivnila růst postranních kořenů méně, ale stále statisticky signifikantně, celková délka poklesla na 65%, počet postranních kořenů 1. řádu na 38 %. Inhibice elongace kořenů v přítomnosti kadmia byla již opakovaně popsána (Lux et al. 2011). U kukuřice bylo např. pozorováno kompletní zastavení růstu primárního kořene u dvoudenních semenáčků po jednom dni ošetření 500 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Dvoudenní aplikace 100 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ zpomalila růst kořenů o 50% (Seregin et al. 2004). U druhů *Pinus pinaster* a *Pinus pinea* bylo pozorováno narušení elongace kořenů při vystavení 5 μM koncentraci kadmia. U *Pinus pinea* 5 μM Cd omezilo růst hlavního kořene o 33% oproti kontrole, u *Pinus pinaster* o 31% (Arduini et al. 1994). Pokles větvení pod vlivem Cd byl zaznamenán i v dalších pracích, např. u smrku *Picea sitchensis* (Burton et al. 1984) či u vlčího bobu *Lupinus albus*, k čemuž došlo ale až při koncentraci 100 μM Cd (Costa a Spitz 1997). Inhibice větvení pod vlivem

toxicity kadmia však nebyla pozorována vždy. Např. u *Brassica juncea* a *Brassica napus* vyvolala aplikace 40 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ v hydroponii zvýšení počtu postranních kořenů (Vatehová et al. 2012).

Negativní vliv kadmia na růst příp. větvení kořenů souvisí s mechanismem toxicity kadmia v pletivech. Kadmium umí vytěsnit esenciální kovy z metaloproteinů a tím narušit fyziologické procesy v rostlině. Svou chemickou strukturou je totiž podobné esenciálním minerálním prvkům Zn či Fe (Wan a Zhang 2012). Uvolnění těchto kationtů může vést k oxidativnímu stresu (Stohs et al. 2000). Akumulace Cd v rostlinách má za následek různé projevy jeho toxicity. Například chlorózy, vadnutí, omezení růstu, buněčnou smrt, změny ve struktuře chloroplastů, zvýšení produkce ROS (reaktivních forem kyslíku) (Herbette et al. 2006; Wan a Zhang 2012). Cd má vliv i na cytoskelet rostliny. Efekt Cd na mikrotubuly a aktinová filamenta byl testován např. u zelené řasy *Spirogyra decimina* (Příbyl et al. 2005). Více na přítomnost Cd reagovaly mikrotubuly. Buď došlo k jejich rozpadu na fragmenty, nebo nebyly vůbec pozorovatelné. K narušení aktinových filament docházelo vždy až několik hodin po rozpadu mikrofilament, bez ohledu na koncentraci Cd. Po vymytí Cd se aktinová filamenta znovu vytvořila i po vystavení vysokým koncentracím Cd (40 a 100 μM Cd). Mnohem citlivější mikrotubuly se znovu vytvořily pouze, pokud byly buňky vystaveny nižším koncentracím Cd (10 a 15 μM). Po vystavení hrachu *Pisum sativum* Cd (0,25; 25 a 250 μM Cd) došlo také k narušení architektury mikrotubulů. Dále také ke snížení mitotického indexu a k výskytu mitotických aberací (Fusconi et al. 2007). Narušení aktinových filament souvisí se změnami ve váčkovém transportu a stavbou buněčné stěny. Spolu s tím tyto jevy ovlivňuje i narušení Ca^{2+} gradientu, také způsobené přítomností Cd. U kořenových vlásků *Arabidopsis* bylo pozorováno (Obr. 11.1), že váčkový transport je narušen právě proto, že váčky nemohou být transportovány podél aktinových filament (Fan et al. 2011).



Obr. 11.1: Model ukazuje hlavní efekty CdCl_2 na špičku rostoucího kořenového vlásku *Arabidopsis*. Cd narušuje ER (1) a mitochondrie (2). Posílení odtoku Ca^{2+} vede ke změně gradientu a následnému narušení aktinových filament (3). Následně dochází k narušení váčkového transportu (4), které má za následek změny ve složení buněčné stěny. K narušení apikálního růstu kořenového vlásku ještě přispívá vakuolizace (5) a poškození buněčné stěny (6). Převzato z (Fan et al. 2011).

11.2 Apoplastické bariéry v kořenech pod vlivem kadmia

11.2.1 Kadmium posílilo diferenciaci apoplastických bariér

Výraznou změnou, která byla pozorována i po působení těžkých kovů i ostatních stresových faktorů, je urychlení diferenciace apoplastických bariér v kořenech (Reinhardt a Rost 1995; Karahara et al. 2004; Meyer et al. 2009; Lux et al. 2011; Vatehová et al. 2012; Vaculík et al. 2012; Shen et al. 2014). To bylo zdokumentováno i v této práci (např. Obr. 10.3 a 10.4). Po vystavení Cd byla např. šířka Casparyho proužků větší než u kontrolních kořenů.

Nezbytnou apoplastickou bariérou kořene je endodermis (de Lavison 1910; Esau 1953; Van Fleet 1961; Enstone et al. 2003; Geldner 2013). Zpravidla se vyvíjí velmi blízko kořenové špičce. Toxicita kadmia nicméně tuto vzdálenost ještě zmenšuje a diferencované endodermální Casparyho proužky jsou patrně blíže kořenové špičce než v kontrolních podmínkách (Lux et al. 2011; Vaculík et al. 2012b). Podobně působí i toxicita jiných těžkých kovů, např. zinku (Stoláriková et al. 2012). V této diplomové práci byl nicméně analyzován stupeň diferenciace bariér ve $\frac{3}{4}$ délky hlavního kořene (bazální část) a také v bazálních částech vybraných

postranních kořenů. Hlavním smyslem tedy nebylo podchytit rychlost diferenciaci v těsné blízkosti za špičkou kořene, ale naopak srovnat maximální stupeň diferenciaci endodermis (a především exodermis) v různých typech kořenů - v postranních kořenech v porovnání s hlavní osou kořene. V souvislosti s tím pak analyzovat význam postranních kořenů v celkové reakci rostliny na působení stresového faktoru.

Nepřekvapuje, že Casparyho proužky byly v analyzovaných bazálních částech kořenů vyvinuty ve všech buňkách endodermis v kontrolní i kadmiových variantách. Šířka proužků nicméně byla větší při působení kadmia. Podobný efekt vyvolalo v endodermis kukuřice také působení salinity (Karahara et al. 2004). Kadmium vyvolalo také posun v ukládání suberinových lamel. Se vzrůstající koncentrací kadmia stoupal podíl endodermálních buněk s uloženou suberinovou lamelou. Varianta s 5 μM Cd se v tomto parametru signifikantně lišila oproti kontrolní variantě. Varianta z 50 μM se signifikantně lišila oproti oběma ostatním variantám. Suberin je velmi hydrofobní, proto jeho ukládání omezuje nekontrolovaný transport vody, iontů a plynů v rostlině (Enstone et al. 2003; Franke a Schreiber 2007). To může také přispívat k lepší regulaci vstupu Cd do středního válce, protože je možno předpokládat, že suberinová lamela omezuje přístupnost membrány a redukuje tak vstup látek z apoplastu do cytoplasmy endodermálních buněk (Barberon a Geldner 2014; Andersen et al. 2015; Barberon et al. 2016). Posílenou suberinizací nebo přítomností uložených suberinových lamel blíže kořenové špičce v podmínkách toxicity dokumentuje i řada dalších prací (Stoláriková et al. 2012; Vatehová et al. 2012; Vaculík et al. 2012b). V endodermis, na rozdíl od exodermis, došlo také k masivnějšímu uložení sekundární buněčné stěny (U-ztlustlin; terciálních stěn) ve variantách s kadmíem, především v 50 μM koncentraci kadmia. Funkce endodermálních U-ztlustlin není ještě zcela vyjasněna, ale předpokládá se, že je pravděpodobně především mechanická (Zeier et al. 1999; Enstone et al. 2003). Vzhledem k jejich výraznějšímu uložení v kořenech kadmiových variant se nicméně může ukládání sekundární buněčné stěny jevit jako další způsob obrany.

Exodermální vrstva reaguje oproti endodermis na změny v podmínkách prostředí ještě výrazněji, jak již bylo také zdokumentováno při působení různých stresových faktorů (Karahara et al. 2004; Ederli et al. 2004; Lux et al. 2011; Redjala et al. 2011). Posílenou diferenciací exodermis jsme proto očekávali i po aplikaci kadmia, tento předpoklad se však naplnil jen částečně. U adventivních kořenů cibule (experiment 2) byly exodermální proužky (analyzováno v pozici $\frac{3}{4}$ délky hlavní osy kořene, tj. v bazální části) masivněji lignifikované oproti kontrolní

i hypoxické variantě (v hypoxické variantě se dokonce téměř nevyskytovaly). U kukuřice (experiment 1) byla diferenciace Casparyho proužků i ukládání suberinových lamel v exodermis signifikantně posílena u kořenů z 5 μM Cd oproti kontrolním podmínkám. Tento trend byl však patrný především v hlavní ose primárního kořene a delších postranních kořenech, krátké postranní kořeny diferencovaly exodermis velmi málo bez ohledu na variantu. V postranních kořenech z 50 μM Cd došlo dokonce spíše k ukládání extracelulárního materiálu či nepravidelné lignifikaci v oblasti primární kůry, nikoli k diferenciaci exodermální vrstvy s Casparyho proužky. Tento jev se dá vysvětlit jako reakce na příliš velkou koncentraci Cd, protože ukládání extracelulárního materiálu v primární kůře bylo podobně pozorováno např. u rákosu nebo rýže při působení toxicity sulfidů nebo krátkých organických kyselin (Armstrong a Armstrong 2001; Armstrong a Armstrong 2005). Tyto modifikace jsou tedy pravděpodobně známkou poškození kořene. Z toho se dá usuzovat, že koncentrace 50 μM Cd v našem experimentu již přesáhla toleranci kukuřice ve smyslu schopnosti reagovat na působící stres posílením diferenciace exodermis v krátkých postranních kořenech.

11.2.2 Rozdíly mezi hlavním kořenem a postranními kořeny

Kořenový systém je komplexní útvar, který se skládá z různých typů kořenů. Většinou je pozornost věnována kořenům hlavním. Kořeny postranní však tvoří neméně důležitou součást kořenového systému, jejíž vlastnosti mohou výrazně ovlivnit rostlinu. Proto byla postranním kořenům věnována hlavní pozornost v našem experimentu i v celém projektu COST (Apoplastické bariéry v interakci rostliny s půdním prostředím), jehož byl tento experiment součástí a který analyzoval i další typy stresů.

Skutečnost, že mezi hlavními a postranními kořeny opravdu existují rozdíly, ukazují články (Soukup et al. 2002; Faiyue et al. 2010). U rýže stresované NaCl byl pomocí apoplastické sondy PTS (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát) měřen tok vody do kořenů. Ten byl u postranních kořenů oproti hlavnímu kořeni vyšší. U postranních kořenů rýže bylo také pomocí značení berberinem a anilinovou modří zjištěno, že u nich nebyla vyvinuta exodermální vrstva (Ederli et al. 2004). Postranní kořeny hrají u rýže velkou roli při absorpci minerálních látek a vody (Wang et al. 2006). Větší propustnost apoplastu postranních kořenů byla pozorována také u rákosu (Soukup et al. 2002). Obě tyto práce tedy naznačují výrazně větší propustnost postranních kořenů oproti hlavní ose kořene. Vzhledem k tomu, že postranní kořeny tvoří dominantní část absorpční plochy komplexního kořenového systému, jsou jejich transportní vlastnosti velmi důležité v interakci rostliny s půdním prostředím (regulaci vstupu látek včetně polutantů).

Širší Casparyho proužky v endodermis vypovídají o posílení jejich ochranné funkce vůči stresu z Cd, což bylo podobně dokumentováno pro salinitu (Karahara et al. 2004). Ukládání suberinových lamel v endodermis bylo také posíleno. Nejvýraznější rozdíl mezi kontrolou a variantami s kadmíem pak byly v obou těchto parametrech pozorovány především u krátkých postranních kořenů (PKK). To ukazuje schopnost postranních kořenů plasticky reagovat na podmínky prostředí ve smyslu diferenciaci endodermální apoplastické bariéry. V exodermis byly Casparyho proužky diferencovány v hlavním kořeni všech variant. Na rozdíl od hlavních kořenů však byla jejich diferenciaci v postranních kořenech méně výrazná, což koresponduje s dříve dokumentovanou výraznější propustností postranních kořenů u rákosu (Soukup et al. 2002) a rýže (Faiyue et al. 2010). 5 μM Cd částečně stimulovalo diferenciaci exodermis v postranních kořenech, 50 μM Cd způsobilo naopak spíše k poškození patrné především v krátkých postranních kořenech. Z těchto výsledků je patrné, že v porovnání s hlavními kořeny vykazovaly postranní kořeny větší citlivost než kořeny hlavní.

Vliv kadmia tedy závisí průkazně na variantě kultivace (koncentraci kadmia), ale i na typu kořene, který na tento stresový faktor reaguje. Jelikož přítomnost kadmia snižuje také větvení kořene, promítá se toto na reakci celého kořenového systému. Jak bylo uvedeno výše, kořeny z různých pozic kořenové osy se liší ve své odpovědi na přítomnost tohoto toxického kovu. Jakmile je tedy ovlivněno větvení, dochází tím i k ovlivnění počtu a typu kořenů, které na přítomnost Cd reagují. To je důležité i z toho hlediska, že typy kořenů se v odpovědi na stres způsobený Cd liší. V tomto smyslu je zajímavé i zjištění, že při kultivaci kukuřice v pevných substrátech (půdě nebo směsi perlitu a písku) krátké postranní kořeny exodermis diferencují v podstatně větším rozsahu než hydroponii s přidavkem kadmia (Tylová et al. – rukopis v přípravě; výsledky projektu COST zmiňovaného v úvodu práce).

11.3 Propustnost apoplastu

Apoplastické bariéry hrají významnou roli v regulaci příjmu látek do kořene. Jelikož nefungují v stylu „vypnuto X zapnuto“, je důležité nějak testovat, jak např. různé stresové faktory ovlivňují skutečnou propustnost těchto bariér. Pro tyto účely jsou využívány tzv. apoplastické sondy. Tyto sondy jsou látky, které se pohybují apoplastem kořene, ale neprostupují do symplastu nebo prostupují jen v omezené míře. Dosud nebyla nalezena sonda ideální. Použití Fe^{2+} jako sondy je nejstarší zmínkou o takové metodě (de Lavison 1910). Hojně používanými sondami jsou např. propidium jodid (Soukup et al. 2002; Soukup et al. 2007; Naseer et al. 2012), FeSO_4 (Meyer et al. 2009) či organické fluorescenční molekuly (Barnabas 1996; Ochiai a Matoh 2002).

Často používanou apoplastickou sondou je kyselina jodistá. Je vhodná pro svou malou velikost, nikam nedifunduje, nebledne a není možné ji vymýt (Pecková et al., v tisku; Soukup et al. 2002). Tato sonda, která se ukázala dostatečně spolehlivou, byla použita i při našem výzkumu pro testování propustnosti apoplastu povrchových vrstev hlavního a postranních kořenů z jednotlivých variant kultivace. Přesto je nutné výsledky interpretovat s jistou opatrností vzhledem k negativnímu působení kyseliny jodisté na membrány (Pecková et al., v tisku; Soukup et al. 2002). Kyselina jodistá se jako sonda dostává do pletiv a oxidativním štěpením vytváří dialdehydy. Ty se potom lokalizují pomocí Schiffova roztoku (Pearse 1985; Soukup et al. 2002; Soukup et al. 2014). Testy s pomocí kyseliny jodisté ukázaly, že propustnost kořenů ovlivnila varianta pěstování rostlin, tudíž to, zda byly vystaveny působení Cd. U hlavních, dlouhých postranních a středně dlouhých postranních kořenů platilo, že čím více byly rostliny stresované, tím byla propustnost nižší. Z toho se dá usoudit, že výraznější vývoj apoplastických bariér ve stresovaných kořenech (stresovaných kořenů u dalších rostlinných druhů s pomocí různých apoplastických sond (Armstrong et al. 2000; Zimmermann et al. 2000; Schreiber et al. 2005; Krishnamurthy et al. 2011; Shen et al. 2014).

Pokud byla propustnost vyjádřena jako procento šířky primární kůry + pokožky, které bylo probarveno díky kontaktu s pronikající kyselinou jodistou, platil trend klesající propustnosti apoplastu se vzrůstající koncentrací kadmia v kultivaci i pro krátké postranní kořeny. U krátkých kořenů varianty s 50 μM Cd byl nicméně pozorován zajímavý trend. Jak již bylo zmíněno výše, tyto kořeny neměly téměř diferencovanou exodermis. Naopak se u nich nacházely nepravidelné lignifikace buněk primární kůry a extracelulární materiál v mezibuněčných prostorech primární kůry. Tyto modifikace nicméně nezpomalily průnik apoplastické sondy (kyseliny jodisté) do nitra kořene. Absolutní vzdálenost, kam tato sonda pronikla, byla u těchto kořenů výrazně větší než u ostatních variant. Krátké postranní kořeny z kultivace s 50 μM Cd byly nicméně také velmi silné oproti stejně dlouhým kořenům ostatních dvou variant, proto procento primární kůry zasažené sodnou bylo nižší oproti ostatním variantám. To ukazuje, že samotná šířka kořene je parametr, který může ovlivnit, jak velká část vnitřních pletiv bude zasažena pronikajícím stresovým faktorem. Tloušťnutí kořenů pod vlivem těžkých kovů bylo zaznamenáno i v dalších pracích, např. také u kukuřice (Maksimović et al. 2007), topolu (*Populus x euroamericana*) a vrby (*Salix alba*) (Lunáčková et al. 2004), či ozdobnice (Scebba et al. 2006).

11.4 Molekulární mechanismy diferenciace exodermis

11.4.1 Exprese *ZmCASP1* a *ZmCASP2* v kořenech kukuřice

Vznik Casparyho proužku je klíčovým krokem ve vzniku apoplastických bariér. Proto je důležitým cílem odhalit také molekulární pozadí procesu, který ukládání Casparyho proužku zajišťuje. Momentálně známé výsledky se týkají pouze endodermální vrstvy u rostliny *Arabidopsis thaliana* (Roppolo et al. 2011; Geldner 2013; Roppolo et al. 2014). Roppolo et al. (2011) poukázali na to, že existují proteiny, které specificky označují membránovou doménu (CSD), která označuje umístění budoucího Casparyho proužku. Tyto proteiny byly označeny jako CASP1-5. CASP1 je pro vývoj Casparyho proužku důležitý, neboť tvoří komplexy s ostatními proteiny této rodiny. Vytvořené dvojité mutanty *casp1/casp3* vykazovaly narušené formování Casparyho proužků. To poukazuje na jejich roli při lokalizaci a uložení této struktury. V sekvenci CASP proteinů se ukázala být důležitou extracelulární smyčka EL1, která obsahuje velmi konzervovanou sekvenci 9 aminokyselin. Pro otestování, zda tuto sekvenci obsahují funkční homology CASP proteinů, byl protein této rodiny, obsahující sekvenci 9 aminokyselin, přenesen ze štírovníku *Lotus japonicus* do *Arabidopsis*. Byl exprimován pod jeho vlastním promotorem a fúzován s GFP. V *Arabidopsis* došlo nejenom k jeho expresi v endodermis, ale vzniklý protein byl perfektně lokalizován v CSD podobně jako je tomu u AtCASP1-GFP. Díky tomuto výsledku byla následně při hledání homologů CASP proteinů hledána tato specifická sekvence aminokyselin (Roppolo et al. 2014). U parazitické rostliny *Striga asiatica*, která nemá funkční kořeny, se homolog CASP genu s EL1 smyčkou také nachází. Ovšem obsahuje stop kodon, který zamezuje jeho translaci. CASP homology s konzervovanou sekvencí 9 aminokyselin chybí u některých rostlin, které netvoří kořeny nebo mají kořeny jiného evolučního původu (*Utricularia gibba*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*). Dále byla charakterizována rodina proteinů CASPL (CASP-like). Ty se od CASP proteinů odlišují tím, že postrádají konzervovanou sekvenci 9 aminokyselin v extracelulární doméně EL1 (Roppolo et al. 2014).

Pro experimenty v této diplomové práci byla vybrána kukuřice, neboť je to rostlina tvořící exodermální vrstvu. Exodermální vrstva je zatím ve výzkumu molekulárních mechanismů diferenciace opomíjena, neboť je míněno, že je něco jako kopie endodermální vrstvy (Geldner 2013). Abychom zjistili, do jaké míry se molekulární mechanismy diferenciace obou těchto vrstev podobají, naším cílem bylo ověřit, zda nově objevené CASP geny mají obdobnou funkci i v exodermální vrstvě. V článku (Roppolo et al. 2014) jsou popsány sekvence ortologů CASP

proteinů. Pro kukuřici jsou zde uvedeny dva – *ZmCASP1* a *ZmCASP2*. Dále bylo nalezeno i několik kukuřičných *ZmCASPL* proteinů.

V rámci diplomové práce byla snaha analyzovat expresi *ZmCASP1* a *ZmCASP2* genů v exodermis a endodermis nodálních kořenů kukuřice. Jejich exprese byla korelována s anatomickou analýzou kořenů, kdy byl na jednotlivých řezech kořenem ověřován postup diferenciaci endodermální a exodermální vrstvy. Pro spolehlivější určení exprese *ZmCASP1* a *ZmCASP2* byly segmenty kořene rozdělovány v oblasti primární kůry na dvě poloviny tak, aby ve vzorcích ke zpracování (izolaci mRNA) byla přítomna pouze endodermální či pouze exodermální vrstva vždy spolu s okolními pletivy. V endodermis byly ve 2 cm od špičky exprimovány *ZmCASP1* i *ZmCASP2*, 4 a 6 cm od špičky již jen *ZmCASP2*. Exprese korelovala s anatomickými výsledky, kde bylo patrné, že endodermis se vyvinula velmi blízko kořenové špičky do tvaru malých teček. Dále po kořenové ose ke změnám v jejím charakteru již nedošlo.

V exodermis byl *ZmCASP2* exprimován také ve všech vzorcích podél kořenové osy. To můžeme připisovat jeho konstitutivní expresi a bude nutné tento výsledek ještě prověřit dalšími experimenty (vyloučit případnou kontaminaci vzorků genomovou DNA). Ovšem exprese *ZmCASP1* byla zachycena pouze ve vzorku vzdáleném 4 cm od kořenové špičky a v tomto případě byl zcela jistě zachycen transkript, což potvrdila sekvenace daného vzorku. Lokalizace zachycené exprese *ZmCASP1* v exodermis naprosto odpovídá anatomickým výsledkům, kde můžeme v oblasti cca 5 cm od kořenové špičky pozorovat náhlý skok ve vývoji exodermální vrstvy – objevení lignifikovaných Casparyho proužků detekovatelných berberinem. Exprese *ZmCASP1* tedy těsně předchází ustavení Casparyho proužků, což koresponduje s popsanou funkcí CASP proteinů v endodermis *Arabidopsis* (Roppolo et al. 2011; Geldner 2013; Roppolo et al. 2014).

11.4.2 Další pokračování experimentální práce

Výsledky získané v této diplomové práci naznačují, že *ZmCASP1* se podílí na zakládání Casparyho proužku, kdežto *ZmCASP2* se vyskytuje spíše konstitutivně. Zároveň mají *ZmCASP1* a *ZmCASP2* zřejmě funkci nejen v endodermální, ale i exodermální vrstvě. Tyto výsledky je nicméně třeba dále podpořit podrobnější analýzou. V dalších experimentech proto budou dále analyzovány ortology *CASP* a *CASPL* genů u rostlin, které tvoří exodermální vrstvu (především kukuřice a rýže). Podobným způsobem budou analyzovány i další již popsané geny účastníci se vývoje endodermální vrstvy, např. transkripční faktor *MYB36* (Kamiya et al. 2015; Liberman et al. 2015), *SCARECROW* (Di Laurenzio et al. 1996; Long et al. 2015) či enzymy

lokalizované depozice ligninu a suberinu (Roppolo et al. 2011; Hosmani et al. 2013; Roppolo et al. 2014). Pro ověření lokalizace bude vhodné provést translační fúze s fluorescenčními proteiny např. u rýže, pro ověření skutečné lokalizace vybraných proteinů v endodermální či exodermální vrstvě.

12. Závěr

Hlavním úkolem této práce bylo zmapování variability při utváření apoplastických bariér pod vlivem kadmia jako stresového faktoru a bližší pohled na molekulární podstatu utváření Casparyho proužků. Jako modelová rostlina posloužila kukuřice, neboť se u ní diferencuje i exodermální vrstva. U rostlin vystavených vlivu kadmia byl zmapován nejen trend v ukládání endodermálních a exodermálních bariér, ale hlavně rozdíly mezi hlavním kořenem a různými typy kořenů postranních. Jelikož se postranním kořenům práce téměř nevěnují, jde o významný vhled do problematiky odpovědi na stresový faktor v rámci rhizosféry. Díky sledování různých typů kořenů byla lépe postihnuta variabilita exodermální vrstvy, která je více ovlivněna okolními podmínkami prostředí na rozdíl od vrstvy endodermální.

Následně byl výzkum soustředěn na molekulární pozadí vývoje exodermální vrstvy. Výzkum vycházel z recentních poznatků o účasti membránových proteinů CASP na vývoji endodermis. CASP proteiny byly popsány jako klíčové pro lokalizovanou depozici ligninu v endodermálních Casparyho proužcích. Dle našeho výzkumu se ukázalo, že jsou pravděpodobně podobně zapojeny i při vývoji exodermis, ale tyto výsledky bude nutné podložit dalšími experimenty, které jsou plánované v rámci navazujícího doktorského studia. Více pozornosti vzbudil *ZmCASPI*, neboť jeho zatím zachycená exprese korelovala s vývojem Casparyho proužků, který byl zachycen pomocí anatomické analýzy. Vedle toho exprese *ZmCASP2* se zatím jeví jako konstitutivní a nereflektující přímo nástup vývoje Casparyho proužků. Tato zjištění otvírají zajímavé pole působnosti pro další výzkum.

13. Seznam použité literatury

- Alassimone J, Naseer S, Geldner N (2010) A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5214–5219. doi: 10.1073/pnas.0910772107
- Alassimone J, Roppolo D, Geldner N, Vermeer JEM (2012) The endodermis-development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249:433–443.
- Aloni R, Enstone DE, Peterson CA (1998) Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207:1–7.
- Andersen TG, Barberon M, Geldner N (2015) Suberization-the second life of an endodermal cell. *Curr Opin Plant Biol* 28:9–15.
- Arduini I, Godbold DL, Onnis A (1994) Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. *Physiol Plant* 92:675–680.
- Armstrong J, Armstrong W (2001) Rice and Phragmites: Effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *Am J Bot* 88:1359–1370.
- Armstrong J, Armstrong W (2005) Rice: Sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence. *Ann Bot* 96:625–638.
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, et al (2000) Oxygen Distribution in Wetland Plant Roots and Permeability Barriers to Gas-exchange with the Rhizosphere: a Microelectrode and Modelling Study with *Phragmites australis*. *Ann Bot* 86:687–703.
- Barberon M, Geldner N (2014) Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiol* 166:528–37.
- Barberon M, Vermeer JEM, De Bellis D, et al (2016) Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* 164:447–459.
- Barnabas AD (1996) Casparian band-like structures in the root hypodermis of some aquatic angiosperms. *Aquat Bot* 55:217–225.
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, et al (2009) Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*.
- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, et al (1993) Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119:57–70.

- Bernards M (2002) Demystifying suberin.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54:519–546.
- Brundrett M, Kendrick B (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol.
- Brundrett M, Murase G, Kendrick B (1990) Comparative anatomy of roots and mycorrhizae of common Ontario trees. *Can J Bot* 68:551–578.
- Brundrett MC, Scade A, Batty AL, et al (1988) Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycol Res* 107:1210–1220.
- Burton K, Morgan E, Roig A (1984) The influence of heavy metals upon the growth of sitka-spruce in South Wales forests.
- Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiol* 110:3–13.
- Caspary R (1865) Bemerkungen über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel.
- Clarkson DT (1993) Roots and the Delivery of Solutes to the Xylem. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 341:5–17.
- Colmer TD (2003) Long-distance transport of gases in plants: A perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell Environ* 26:17–36.
- Costa G, Spitz E (1997) Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci* 128:131–140.
- Cruz RT, Jordan WR, Drew MC (1992) Structural Changes and Associated Reduction of Hydraulic Conductance in Roots of *Sorghum bicolor* L. following Exposure to Water Deficit. *Plant Physiol* 99:203–12.
- Cui H, Levesque MP, Vernoux T, et al (2007) An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316:421–5.
- Damus M, Peterson RL, Enstone DE, Peterson CA (1997) Modifications of cortical cell walls

- in roots of seedless vascular plants. *Bot Acta* 110:190–195.
- Davin LB, Wang H-B, Crowell AL, et al (1997) Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center.
- de Lavison R (1910) Du mode de pénétration de quelques sels dans la plante vivante. Role de l'endoderme. *Rev Gen Bot* 22:225–241.
- Degenhardt B, Gimmler H (2000) Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *J Exp Bot* 51:595–603.
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, et al (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86:423–433.
- Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demarsy E, et al (2011) Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* 13:447–52.
- Ederli L, Reale L, Ferranti F, Pasqualini S (2004) Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol Plant* 121:66–74.
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003) Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *J Plant Growth Regul* 21:335–351.
- Esau K (1953) Plant anatomy.
- Faiyue B, Al-Azzawi MJ, Flowers TJ (2010) The role of lateral roots in bypass flow in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell Environ* 33:702–716.
- Fan JL, Wei XZ, Wan LC, et al (2011) Disarrangement of actin filaments and Ca²⁺ gradient by CdCl₂ alters cell wall construction in Arabidopsis thaliana root hairs by inhibiting vesicular trafficking. *J Plant Physiol* 168:1157–1167.
- Fernandez-Garcia N, Lopez-Perez L, Hernandez M, Olmos E (2009) Role of phi cells and the endodermis under salt stress in Brassica oleracea. *New Phytol* 181:347–360.
- Franke R, Schreiber L (2007) Suberin-a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 10:252–9.
- Fusconi A, Gallo C, Camusso W (2007) Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. *Mutat Res* 632:9–19.

- Geldner N (2013) The endodermis. *Annu Rev Plant Biol* 64:531–58.
- Graça J, Santos S (2007) Suberin: A biopolyester of plants' skin. *Macromol Biosci* 7:128–135.
- Haas DL, Carothers ZB (1975) Some ultrastructural observations on endodermal cell development in *Zea mays* roots. *Bot Soc Am , Inc* 62:336–348.
- Haas DL, Carothers ZB, Robbins RR, et al (1976) Observations on the Phi-Thickenings and Casparian Strips in *Pelargonium* Roots. *Am J Bot* 63:863–867.
- Hassan H, Scheres B, Blilou I (2010) JACKDAW controls epidermal patterning in the *Arabidopsis* root meristem through a non-cell-autonomous mechanism. *Development* 137:1523–1529.
- He ZL, Yang XE, Stoffella PJ (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19:125–140.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, et al (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101:555–567.
- Herawati N, Suzuki S, Hayashi K, et al (2000) Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:33–39.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, et al (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* 88:1751–1765.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. In: *Circular. California Agricultural Experiment Station*. p 347
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, et al (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J Exp Bot* 52:2245–64.
- Hose E, Steudle E, Hartung W (2000) Absciscic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta* 211:874–882.
- Hosmani PS, Kamiya T, Danku J, et al (2013) Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proc Natl Acad Sci* 110:16283–16283.
- Hwang Y-H, Chen S-C (1995) Salt tolerance in seedlings of the mangrove *Kandelia candel* (L.) Druce, Rhizophoraceae. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36:25–31.

- Cheng H, Chen DT, Tam NFY, et al (2012a) Interactions among Fe²⁺, S²⁻, and Zn²⁺ tolerance, root anatomy, and radial oxygen loss in mangrove plants. *J Exp Bot* 63:2619–2630.
- Cheng H, Tam NFY, Wang Y, et al (2012b) Effects of copper on growth, radial oxygen loss and root permeability of seedlings of the mangroves *Bruguiera gymnorhiza* and *Rhizophora stylosa*. *Plant Soil* 359:255–266.
- Kamiya T, Borghi M, Wang P, et al (2015) The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proc Natl Acad Sci* 112:10533–10538.
- Karahara I, Ikeda A, Kondo T, Uetake Y (2004) Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219:41–47.
- Karahara I, Shibaoka H (1994) The Casparian strip in pea epicotyls: Effects of light on its development. *Planta* 192:269–275.
- Knipfer T, Fricke W (2010) Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol* 187:159–170.
- Kotula L, Ranathunge K, Schreiber L, Steudle E (2009) Functional and chemical comparison of apoplastic barriers to radial oxygen loss in roots of rice (*Oryza sativa* L.) grown in aerated or deoxygenated solution. *J Exp Bot* 60:2155–2167.
- Kotula L, Steudle E (2009) Measurements of oxygen permeability coefficients of rice (*Oryza sativa* L.) roots using a new perfusion technique. *J Exp Bot* 60:567–580.
- Krishnamurthy P, Jyothi-Prakash PA, Qin L, et al (2014) Role of root hydrophobic barriers in salt exclusion of a mangrove plant *Avicennia officinalis*. *Plant, Cell Environ* 37:1656–1671.
- Krishnamurthy P, Ranathunge K, Nayak S, et al (2011) Root apoplastic barriers block Na⁺ transport to shoots in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 62:4215–4228.
- Kroemer K (1903) Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibl Bot* 59:1–148.
- Lane TW, Morel FMM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci* 97:4627–4631.
- Laštůvka Z, Minář J (1967) Metoda vodních kultur vyšších rostlin. Univerzita JE Purkyně

- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N (2013) A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* 153:402–412.
- Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, et al (2000) Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* 211:816–22.
- Liberman LM, Sparks EE, Moreno-Risueno MA, et al (2015) MYB36 regulates the transition from proliferation to differentiation in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:12099–104.
- Lin Y, Zhang C, Lan H, et al (2014) Validation of Potential Reference Genes for qPCR in Maize across Abiotic Stresses, Hormone Treatments, and Tissue Types. *PLoS One* 9:e95445.
- Long Y, Goedhart J, Schneijderberg M, et al (2015) SCARECROW-LIKE23 and SCARECROW jointly specify endodermal cell fate but distinctly control SHORT-ROOT movement. *Plant J* 84:773–784.
- Lunáčková L, Šottníková A, Masarovičová E, et al (2004) Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. *Biol Plant* 47:403–411.
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62:21–37.
- Lux A, Šottníková A, Opatrná J, Greger M (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiol Plant* 120:537–545.
- Ma F, Peterson C (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Can J Bot* 81:405–421.
- Ma F, Peterson C (2001) Frequencies of plasmodesmata in *Allium cepa* L. roots: implications for solute transport pathways. *J Exp Bot* 52:1051–1061.
- Ma F, Peterson C (2000) Plasmodesmata in onion (*Allium cepa* L.) roots: a study enabled by improved fixation and embedding techniques. *Protoplasma* 211:103–115.
- Ma JF, Yamaji N (2015) A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci* 20:435–442.
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, et al (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*

448:209–212.

- Maksimović I, Kastori R, Krstić L, Luković J (2007) Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. *Biol Plant* 51:589–592.
- Meyer CJ, Peterson CA, Steudle E (2011) Permeability of *Iris germanica*'s multiseriate exodermis to water, NaCl, and ethanol. *J Exp Bot* 62:1911–1926.
- Meyer CJ, Seago JL, Peterson CA (2009) Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Ann Bot* 103:687–702.
- Mitani N, Chiba Y, Yamaji N, Ma JF (2009) Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *Plant Cell* 21:2133–2142.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–81.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environ Chem Lett* 8:199–216.
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, et al (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:10101–6.
- Ogasawara H, Kaimi R, Colasanti J, Kozaki A (2011) Activity of transcription factor JACKDAW is essential for SHR/SCR-dependent activation of SCARECROW and MAGPIE and is modulated by reciprocal interactions with MAGPIE, SCARECROW and SHORT ROOT. *Plant Mol Biol* 77:489–499.
- Ochiai K, Matoh T (2002) Characterization of the Na⁺ delivery from roots to shoots in rice under saline stress: Excessive salt enhances apoplastic transport in rice plants. *Soil Sci Plant Nutr* 48:371–378.
- Padmavathiamma PK, Li LY (2007) Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut* 184:105–126.
- Pearse AGE (1985) Histochemistry, theoretical and applied, Volume 2: Analytical technology.
- Pecková E, Tylová E, Soukup A Tracing root permeability : comparison of tracer methods. 1–11.
- Perumalla C, Peterson CA, Enstone DE (1990) A survey of angiosperm species to detect

- hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Bot J Linn Soc* 103.2:93–112.
- Peterson C a, Perumalla CJ (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Bot J Linn Soc* 103:93–112.
- Peterson CA, Enstone DE (1996) Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiol Plant* 97:592–598.
- Peterson CA, Murrmann M, Steudle E (1993) Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190:127–136.
- Pinkert A, Goeke DF, Marsh KN, Pang S (2011) Extracting wood lignin without dissolving or degrading cellulose: investigations on the use of food additive-derived ionic liquids. *Green Chem* 13:3124.
- Ponnamperuma F (1984) Effects of flooding on soils.
- Příbyl P, Cepák V, Zachleder V (2005) Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium. *Protoplasma* 226:231–240.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, et al (1999) The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18:111–119.
- Ranathunge K, Steudle E, Lafitte R (2005a) A new precipitation technique provides evidence for the permeability of Casparian bands to ions in young roots of corn (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell Environ* 28:1450–1462.
- Ranathunge K, Steudle E, Lafitte R (2005b) Blockage of apoplastic bypass-flow of water in rice roots by insoluble salt precipitates analogous to a Pfeffer cell. *Plant, Cell Environ* 28:121–133.
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, et al (2011) Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environ Exp Bot* 71:241–248.
- Reinhardt DH, Rost TL (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environ Exp Bot* 35:563–574.

- Roppolo D, Boeckmann B, Pfister A, et al (2014) Functional and evolutionary analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN family. *Plant Physiol* 165:1709–1722.
- Roppolo D, De Rybel B, Dénervaud Tendon V, et al (2011) A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473:380–3.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41:105–130.
- Scebba F, Arduini I, Ercoli L, Sebastiani L (2006) Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. *Biol Plant* 50:688–692.
- Seregin I V., Kozhevnikova a. D (2011) Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russ J Plant Physiol* 55:1–22.
- Seregin I V., Shpigun LK, Ivanov VB (2004) Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots. *Russ J Plant Physiol* 51:525–533.
- Seregin I V, Ivanov VB (2001) Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. 48:523–544.
- Shallari S, Schwartz C, Hasko a, Morel JL (1998) Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania1981. *Sci Total Environ* 209:133–142.
- Shen J, Xu G, Zheng HQ (2014) Apoplastic barrier development and water transport in *Zea mays* seedling roots under salt and osmotic stresses. *Protoplasma* 252:173–180.
- Schreiber L, Franke R, Hartmann KD, et al (2005) The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *J Exp Bot* 56:1427–1436.
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J Exp Bot* 50:1267–1280.
- Slewinski TL, Anderson AA, Zhang C, Turgeon R (2012) Scarecrow plays a role in establishing Kranz anatomy in maize leaves. *Plant Cell Physiol* 53:2030–2037.
- Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, et al (2007) Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: A chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytol* 173:264–278.

- Soukup A, Tylová E, Žárský V, Cvrčková F (2014) Plant Cell Morphogenesis.
- Soukup A, Votrubova O, Cizkova H (2002) Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytol* 153:277–287.
- Steudle E, Peterson C a. (1998) How does water get through roots? *J Exp Bot* 49:775–788.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M (2000) Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:201–13.
- Stoláriková M, Vaculík M, Lux A, et al (2012) Anatomical differences of poplar (*Populus × euramericana* clone I-214) roots exposed to zinc excess. *Biologia (Bratisl)* 67:483–489.
- Takano J, Miwa K, Fujiwara T (2008) Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci* 13:451–457.
- Takano J, Tanaka M, Toyoda A, et al (2010) Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5220–5225.
- Takano J, Wada M, Ludewig U, et al (2006) The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18:1498–1509.
- Taleisnik E, Peyrano G, Cordoba a., Arias C (1999) Water Retention Capacity in Root Segments Differing in the Degree of Exodermis Development. *Ann Bot* 83:19–27.
- Vaculík M, Konlechner C, Langer I, et al (2012a) Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environ Pollut* 163:117–26.
- Vaculík M, Landberg T, Greger M, et al (2012b) Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. *Ann Bot* 110:433–43.
- Vaculík M, Lux A, Luxová M, et al (2009) Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environ Exp Bot* 67:52–58.
- Van Fleet DS (1961) Histochemistry and function of the endodermis.
- Vatehová Z, Kollárová K, Zelko I, et al (2012) Interaction of silicon and cadmium in *Brassica juncea* and *Brassica napus*. *Biologia (Bratisl)* 67:498–504.

- Vishwanath SJ, Delude C, Domergue F, Rowland O (2015) Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. *Plant Cell Rep* 34:573–586.
- Vitoria AP, Cunha M, Rodriguez a. PM, et al (2003) Structural changes in radish seedlings (*Raphanus sativus*) exposed to cadmium. *Biol Plant* 47:561–568.
- von Guttenberg H (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. pp 141–159
- Wan L, Zhang H (2012) Cadmium toxicity. *Plant Signal Behav* 7:345–348.
- Wang H, Taketa S, Miyao A, et al (2006) Isolation of a novel lateral-rootless mutant in rice (*Oryza sativa* L.) with reduced sensitivity to auxin. *Plant Sci* 170:70–77.
- Welch D, Hassan H, Blilou I, et al (2007) Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes Dev* 21:2196–2204.
- White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann Bot* 105:1073–1080.
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209:1–12.
- Zeier J, Schreiber L (1998) Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledonous species: Chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206:349–361.
- Zeier J, Schreiber L (1997) Chemical Composition of Hypodermal and Endodermal Cell Walls and Xylem Vessels Isolated from *Clivia miniata*. *Plant Physiol* 1223–1231.
- Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210:302–11.
- Zimmermann HM, Steudle E (1998) Apoplastic transport across young maize roots: Effect of the exodermis. *Planta* 206:7–19.